LA SECRETION D'INSULINE
ET
LE CONTENU DU DUODENUM

par

Antoine Zermatten

These présentée à la Faculté des Sciences

de l'Université de Lausanne

en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

Clausthal-Zellerfeld

Bönecke-Druck

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546820_0031

LA SECRETION D'INSULINE
ET
LE CONTENU DU DUODENUM

par
Antoine Zermatten

These présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Lausanne
en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR ES SCIENCES

Clausthal-Zellerfeld
Bönecke-Druck
1976

Imprimatur

Université de Lausanne
Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

MM les Professeurs J.-P. Felber, directeur de thèse, L. Fauconnet rapporteur de la Faculté, A. Delessert, président du jury

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

M. Antoine Zermatten, licencié ès sciences de l'Université de Lausanne

intitulée "La sécrétion d'insuline et le contenu du duodénum"

Lausanne, le 6 juillet 1976

Le doyen de la Faculté des Sciences:
André Delessert

UNIV. LEIDEN BIBL.

L'auteur de cette thèse se fait un devoir et un plaisir d'adresser l'expression de sa profonde gratitude aux professeurs et aux chercheurs qui l'ont aidé dans son travail mené à chef dans la division de Biochimie Clinique de l'Hôpital Nestlé à Lausanne.

En premier lieu, il remercie les Professeurs A.Vanotti et L. Freedman qui l'ont accueilli avec bienveillance dans cette institution qui doit une grande part de son rayonnement à leur autorité.

Mon remerciement le plus ému s'adresse à Mr. le Professeur J.P Felber, directeur scientifique de ma thèse. Si j'ai pu réaliser un projet qui lui tenait à coeur, je le dois à sa constante disponibilité qui n'eut d'égales que sa patience et sa bienveillance. Ses exigences scientifiques furent toujours enveloppées de courtoisie et d'esprit de finesse.

Je n'aurai garde d'oublier, à l'instant où je vois la fin de ces recherches, tout ce que je dois à Mr. le Professeur L. Fauconnet représentant de la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne. Il a consacré un temps précieux à suivre l'élaboration de ce travail. Ainsi, du reste que le Dr. W. Heptner dont l'enthousiasme et les nombreuses suggestions m'ont souvent aidé et rendirent ma tâche plus facile.

Cette thèse n'a pu être conduite à ses conclusions que par les concours techniques et pratiques de toute une équipe

amicale. Je cite d'abord Mme C. Bachman dont les travaux de laboratoire me furent si précieux et à qui je dois la composition des figures éclairant mon texte. Mais je me plais à ajouter à son nom ceux de Mme Y. Tornay, de Mlles C. Klein, M. Rolaz, T. Vincks et de Mr. P. Rolino. Comment, sans eux, aurais-je mené à bien tant d'expériences conduites avec ces pauvres victimes innocentes que furent tant de rats? J'ai souvent eu recours aussi aux services dévoués de Mlles M.C. Evraere et P. Ballay et de MM. B. Ess et L. Cuaz.

Je relève en terminant qu'une longue application est possible grâce à un esprit de camaraderie qui rend le travail plus léger. Ce fut l'atmosphère régulière de la Division de Biochimie Clinique de l'Hôpital Nestlé.

Enfin, comment ne pas reconnaître ma dette à l'égard du Fonds National de la Recherche Scientifique et de la maison Hoechst ? Leur soutien financier a rendu possible la réalisation de ce travail.

* * *

ABREVIATIONS

a.a.	:	Acides aminés
AGL (FFA)	:	Acides gras libres (Free fatty acids)
CCK - PZ	:	Cholécystokinine - pancréozymine
DIRA	:	Duodenal insulin releasing activity
2 DG	:	2-désoxy-D-Glucose
etm	:	Ecart type de la moyenne
GIP	:	Gastric inhibitory polypeptide
Glib.	:	Glibenclamide
GLI	:	Glucagon like immunoreactivity
HB 419	:	N° de code pour le glibenclamide
IRI	:	Immunoreactive insulin
Ng	:	Nanogramme
P.c.	:	Poids corporel
Pg.	:	Picogramme
P.O.	:	Per os
µU	:	Micro-unités
VIP	:	Vasoactive intestinal peptide

* * *

R E S U M E

La sécrétion d'insuline et le contenu du duodénum

Une préparation de pancréas de rat "in situ" nous a permis de mettre en évidence dans les muqueuses duodénales humaine et de rat un (ou des) facteur(s) insulinotrope(s) modulé(s) aussi bien par la qualité que par la quantité de la nourriture ingérée. Ce(s) facteur(s), baptisé(s) DIRA pour Duodenal Insulin Releasing Activity a (ont) présenté une activité biphasique positive avec le glucose, l'arginine et le glibenclamide et négative avec l'huile d'arachide et le glycérol. Le 2-désoxy-D-glucose ou l'actinomycine D ont supprimé l'apparition du pic précoce de DIRA.

Nous avons tenté d'extraire le DIRA de la muqueuse duodénale et de préciser quelques unes de ses propriétés physico-chimiques.

Nous avon démontré que le DIRA augmente la quantité d'insuline secrétée après l'administration de glibenclamide.

Le DIRA semble posséder un rôle important de transmetteur hormonal dans l'axe entéro - insulaire,mais ne s'identifie pas, pour l'instant,à quelque hormone gastro - intestinale connue.

TABLE DES MATIERES

	No page
Abréviations	1
Résumé	2
Table des matières	3
I INTRODUCTION	7
II HISTORIQUE	
1. Variations sanguines de la glycémie	11
2. Variations sanguines de l'insulinémie	13
3. Rôle des acides aminés et des graisses Facteur intestinal	15
4. Modèles d'étude	16
5. Dans le sang, la réponse d'insuline précède l'élévation de la glycémie	17
III MATERIEL ET METHODES	
1. Dosage et provenance des produits	19
2. Animaux	24
A. Provenance, âge, jeûne, narcose	24
B. Stimulation de la muqueuse duodénale	27
C. L'essai biologique chez le rat	31

3. Vérifications et contrôles 37

4. Méthode de purification 47

5. Expression des résultats 50

IV RESULTATS

1. Etude de l'effet des glucides sur l'activité duodénale insulinotrope 51

A. Le glucose 51

B. Le glucose en concentrations diverses 56

2. Etude de l'effet des protéines et acides aminés sur l'activité duodénale insulinotrope 59

A. Expérience avec le Nesmida 59

B. Expérience avec l'arginine 61

C. Expérience avec la lysine 64

3. Etude de l'effet des lipides sur l'activité duodénale insulinotrope 66

A. Expérience avec l'huile d'arachide 66

B. Expérience avec le palmitate 69

C. Expérience avec le glycérol 72

4. Approche du mécanisme d'action 73

A. Expérience avec le 2-désoxy-D-glucose 74

B. Expérience avec l'actinomycine D 74

5. Essai de purification 79

6. Etude de l'action d'une sulfonylurée sur l'activité duodénale insulinotrope 83

A. Expérience chez le rat 84

B. Expérience chez l'homme 89

7. Recherche du DIRA dans la circulation sanguine 94

V DISCUSSION

1. L'axe entéro-pancréatique 97

2. Modulation par la nourriture de facteurs duodénaux agissant sur la sécrétion de l'insuline 101

A. Contenu des extraits en aliments 101

B. Modulation du DIRA par les aliments 105

3. Etude de quelques propriétés du facteur duodénal insulinotrope 111

4. Expériences avec le glibenclamide 117

5. Essai d'identification de l'activité duodénale insulino-libératrice 122

A. Sécrétine 122

B. Cholécystokinine-pancréozymine (CCK-PZ) 124

C. Gastrine 125

D. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) 126

E. Glucagon-like immunoreactivity (GLI) 127

F. Motiline, Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) et sérotonine 128

G. Insulin releasing polypeptide (IRP) 128

VI CONCLUSION 130

VII BIBLIOGRAPHIE I

1. Références I

2. Publications sur le DIRA XVIII

* * *

I - INTRODUCTION

Pour survivre dans un environnement où la consommation des substances vitales se fait de façon irrégulière et où l'apport énergétique de ces substances se fait de façon plus irrégulière encore, l'être vivant a adopté un système com - plexe d'apport et d'utilisation d'énergie. Les glucides, les lipides et dans une certaine mesure les protéines sont le carburant de la machine vivante, stockés en période d'abondance, et redistribués en temps de privation. Ce stockage se fait sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux et le foie et de glycogène dans le foie et le muscle.Leur utilisation se fait sous forme d'acides gras et de glucose. Ces deux substrats énergétiques sont employés par presque tous les tissus, sauf par le tissu nerveux et les érythrocytes, qui utilisent surtout le glucose. Ce dernier est donc essentiel au fonctionnement de l'organisme. Aussi, l'organisme a-t-il adopté un système régulateur précis pour assurer l'homéostase du glucose sanguin, pour contrôler et ordonner son assimilation et son utilisation. Ce système régulateur comprend surtout deux hormones,l'insuline et le glucagon.

La coordination qui existe entre l'assimilation et l'utilisation de ces substrats énergétiques suggère l'existence d'un échange d'informations entre le tube digestif, lieu de dégradation des aliments et le pancréas qui, en sécrétant l'insuline et le glucagon, préside à l'utilisation de ces aliments. Une telle idée de correspondance physiologique entre ces deux organes n'est pas nouvelle; elle date de la fin du siècle passé : Biedl et Kraus (1896) montrèrent la différence des réponses physiologiques à l'administration orale ou intraveineuse de nourriture. La découverte de la sécrétine (Bayliss et Starling 1902) concrétisa cette idée de correspondance : un transmetteur chimique, libéré par la nourriture passant dans le tube digestif, semblait être le support idéal pour informer le pancréas de la quantité et de la nature des aliments ingérés. Moore, Edie et Abram (1906) bien avant la découverte des hormones pancréatiques, traitent à Liverpool des patients diabétiques à l'aide d'extraits de muqueuse duodénale de porc, dans l'espoir de stimuler la production d'un facteur contrôlant le métabolisme des glucides. Zunz et Labarre en 1928 tentent de démontrer l'action de la sécrétine sur la libération de l'insuline. Ils distinguent dans leur extrait intestinal un facteur actif sur le pancréas exocrine qu'ils nomment excrétine,alors que la fraction possédant une activité hypoglycémiante est nommée incrétine.

En revanche, Loew, Gray et Ivy (1939) en injectant chez le chien, par voie veineuse ou sous-cutannée des extraits intestinaux n'observent aucune variation dans la glycémie de ces animaux. Ils concluent au manque d'évidence de l'existence d'un contrôle hormonal du duodénum sur le métabolisme des hydrates de carbone. Il faut attendre 1953 pour trouver à nouveau l'idée de relation entéro-pancréatique dans les travaux de Conard puis de Scow et Cornfield (1954) ; Ces travaux vont d'ailleurs susciter un grand nombre de recherches dans le domaine.

La mise au point des méthodes radioimmunologiques (Yalow et Berson, 1960) a permis, par la possibilité qu'elles donnent de déterminer rapidement et avec précision de très faibles quantités d'hormone, de mesurer les variations de l'insulinémie et la glucagonémie et par là même de confirmer l'existence de relations entéro-pancréatiques. Plusieurs travaux vont alors attirer l'attention sur l'importance du mode d'administration des substrats alimentaires (glucose, acides aminés, lipides) et montrer que le taux sanguin de ces produits n'est pas le phénomène initial dans la stimulation de la sécrétion endocrine du pancréas (Elrick et coll. 1964, Dupré 1964, McIntyre et coll. 1964, Unger et Eisentraut 1969, Raptis 1970, Reyes-Leal et coll. 1973). Ces travaux montrent que le tube digestif semble être le siège d'un mécanisme de

stimulation directe du pancréas,déclenché par la nourriture,et dont l'action précède celle mise en jeu par les aliments déjà absorbés,qui agissent sur le pancréas par la voie sanguine.

Le travail exposé dans ces pages traite de la modulation d'un ou plusieurs facteurs insulinotropes de la muqueuse duodénale, par le passage de la nourriture dans le tube digestif. Pour des raisons de méthode, nous nous sommes limités dans notre travail à l'étude des variations sanguines de l'insuline, en négligeant celles du glucagon.

* * *

II -HISTORIQUE

1. VARIATIONS SANGUINES DE LA GLYCEMIE

Scow et Cornfield, en 1954, en étudiant l'apparition et la disparition du glucose dans le sang constatent l'importance de son mode d'administration. Ils obtiennent avec le glucose donné par voie orale une élévation de la glycémie qui n'est que le tiers de celle obtenue lors de son administration par la voie veineuse. Le glucose administré par voie orale disparaît donc beaucoup plus vite de la circulation sanguine qu'une même quantité de ce sucre donné par voie veineuse. Ces auteurs tentent d'expliquer cette différence par l'hypothèse d'une utilisation accrue du glucose par le foie. Cette utilisation serait plus importante lors de l'administration orale de ce sucre que s'il provenait d'une injection périphérique, puisque à la suite de son absorbtion intestinale il est plus concentré dans le sang portal.

Bastenie et coll. (1958), lors de tests de tolérance au glucose chez l'homme, constatent que si du glucose est administré per os avant un deuxième test de tolérance par voie veineuse, le coefficient d'assimilation du glucose (K glucose) est plus important dans le second test que dans le premier.

Ils en déduisent qu'un ou des facteur(s) intervient (nent) lors du passage du glucose par voie orale et qui élèvent le K glucose.

En 1964, Elrick et coll. comparent, à l'aide de tests de tolérance au glucose, l'utilisation de ce sucre chez l'homme après son administration par voie veineuse ou orale. Ils observent que, pour un coefficient d'assimilation de glucose égal pour l'une ou l'autre voie d'administration la réponse du pancréas en insuline est nettement plus élevée lorsque le sucre est donné par voie orale. Après une administration orale de glucose, l'insulinémie est plus élevée et ceci pendant une période plus longue qu'après l'administration de la même dose par voie veineuse. Cette différence serait due, selon ces auteurs, à un stimulus additionnel de la sécrétion d'insuline fourni par le foie ou par le tube digestif.

Ces expériences et celles faites la même année par McIntyre et coll. (1964) et Dupré (1964) vont susciter une activité de recherche intense dans le domaine de l'identification du ou des facteurs intestinaux responsables de cette stimulation additionnelle de la cellule B lors de la prise orale du glucose.

2. VARIATIONS SANGUINES DE L'INSULINEMIE

McIntyre et coll. en 1964, injectent chez l'homme du glucose soit dans le jéjunum soit par voie veineuse (fig.1). Ils mesurent des taux d'insuline plus faibles après l'injec - tion veineuse. Ils émettent alors l'hypothèse de la libéra-

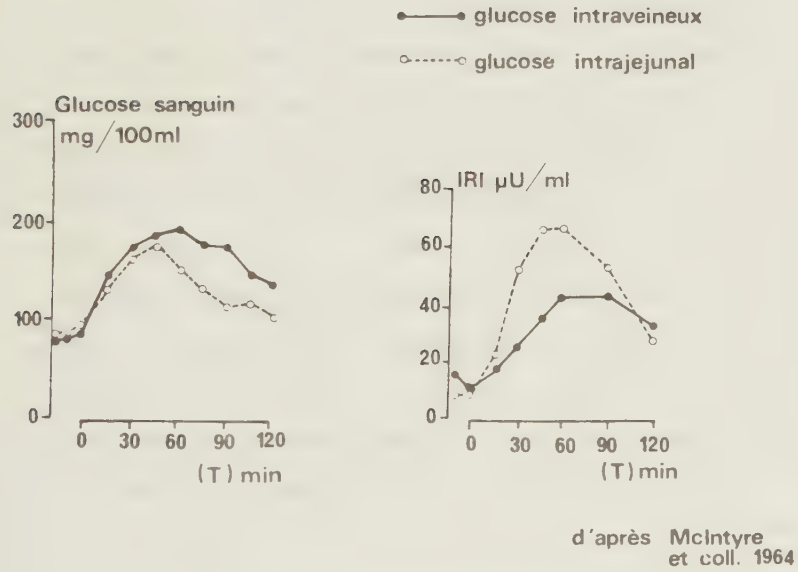


Fig. 1 Variation de l'insulinémie et de la glycémie suivant la voie d'administration d'une quantité identique de glucose.

tion, par la paroi jéjunale, d'une substance de nature hormonale, répondant à l'absorption de glucose. Cette substance renforcerait le stimulus provoqué par l'hyperglycémie sur la cellule B.

Quelques mois plus tard, par un système de deux hyperglycémies successives provoquées par voie intraveineuse, Dupré(1964) ne constate pas de différence dans le taux de disparition du glucose. En revanche, lorsque la seconde hyperglycémie provoquée est additionnée de sécrétine, la disparition du glucose est nettement augmentée et rejoint les valeurs d'une hyperglycémie provoquée par voie intraveineuse qui suivrait une hyperglycémie provoquée par voie orale. Il constate cependant l'absence d'un tel effet, quand le glucose est introduit dans la partie inférieure de l'intestin grêle.

Perley et Kipnis en 1967, montrent que la réponse d'insuline obtenue après le glucose intraveineux n'est que le 30 à 40 % de celle obtenue après le glucose oral; ils en déduisent que des facteurs d'origine intestinale doivent contribuer, avec les variations de la glycémie, au contrôle de la sécrétion de l'insuline.

3. ROLE DES ACIDES AMINES ET DES GRAISSES-FACTEUR INTESTINAL

Dupré et coll. (1969) observent chez des sujets normaux, des variations dans l'insulinémie qui suit une hyperaminoacidémie provoquée par différentes voies d'administration. Ainsi, la même quantité d'arginine donnée par voie orale ou par voie veineuse induit une libération maximale de l'insuline dans le cas du premier mode d'administration.

Raptis et coll. en 1970, donnent par voie veineuse ou orale un mélange de dix adices aminés différents. En mesurant les variations de l'insulinémie, de la glycémie et de l'azote organique ils constatent lors de la libération maximale d'insuline, une heure après le début du test, une augmentation de plus de 30 % lorsque ces acides aminés sont donnés par voie orale. Si la glycémie et le taux des acides gras libres ne varient pas suivant le mode d'administration, le taux sanguin des acides aminés est au contraire plus élevé après la surcharge veineuse. Ils suggèrent, en prenant la CCK-PZ ou l'entéroglucagon pour exemple, que ces hormones intestinales seraient responsables de l'augmentation de l'insulinémie qui suit une administration orale d'acides aminés.

Raptis et coll., en 1973, montrent l'effet de l'huile de soja par voie veineuse ou orale sur la libération de l'insuline. Alors que 75 minutes après la prise orale, ni les

taux d'acides gras libres, ni ceux de glycérol libre n'ont changé de façon significative, le taux d'insuline est à son maximum. Après l'administration veineuse, les maxima d'insuline, d'acides gras libres et de glycérol coïncident plus tard, c'est-à-dire après 150 min. Il semble que les graisses déclenchent également un signal insulino-libérateur lors de leur passage dans le tube digestif.

4. MODELES D'ETUDES

Hadjikhani et coll. en 1967 prélèvent chez l'homme à différents intervalles de temps, au cours d'une hyperglycémie provoquée per os, des fragments intestinaux pour en vérifier l'activité B-cytotrope dans une préparation de pancréas de rat *in situ*. Ils les injectent sous forme d'extrait aqueux dans le tronc coeliaque du rat et mesurent dans le sang portal les variations de l'insulinémie. Ils mettent ainsi en évidence la présence d'un facteur insulino-libérateur dans la muqueuse duodénale humaine, plus actif à 30 et 60 minutes après la surcharge glucosée qu'avant.

Grenier et coll. en 1969, à l'aide d'une méthode de circulation extracorporelle couplée, d'intestin et de pancréas de chien, font une démonstration convaincante de la participation du tube digestif à la régulation de l'insuline. Par leur

méthode, qui permet d'écarter les influences nerveuses, ils montrent que du glucose, dans la lumière intestinale d'une anse jéjunale isolée, agit sur la libération d'insuline par l'intermédiaire d'une substance élaborée par l'intestin lui-même. Cette substance ne semble pas être la sécrétine puisque la sécrétion exocrine ne subit pas de modification.

5. DANS LE SANG LA REPONSE D'INSULINE PRECEDE L'ELEVATION DE LA GLYCEMIE

Fisher et coll. en 1972, montrent qu'il y a chez le chien une augmentation de l'IRI périphérique qui précède celle du glucose après une surcharge orale de ce produit.De plus, l'administration orale d'eau potable, sans faire varier la glycémie ou le taux des acides gras libres (AGL) élève l'insulinémie 20 minutes plus tard. Ce fait suggère la présence d'un facteur d'origine entérique agissant de façon non spécifique sur la cellule B. Fisher suppose que la libération biphasique d'insuline observée après administration orale de glucose provient, pour le premier pic, d'un signal nerveux ou hormonal (sécrétine) et pour le second, d'un signal hormonal exclusivement.

Reyes-Leal et coll. en 1973, cathétérisant chez l'homme la veine porte au travers des vestiges de la veine ombili -

cale mesurent les variations portales de l'insulinémie et de la glycémie au cours de surcharges orales de glucose. Alors que l'insuline est libérée déjà 2 minutes après cette surcharge, la glycémie n'augmente qu'après 8 minutes. Le glucose ne peut donc pas être responsable de cette stimulation d'insuline par voie directe, mais peut-être par l'intermédiaire d'un facteur intestinal.

L'explication la plus vraisemblable de la différence observée entre les insulinémies qui suivent l'administration orale ou veineuse des substrats alimentaires est la suivente : le passage de l'aliment par la voie digestive déclenche par activation ou libération, un ou plusieurs facteurs qui vont, par voie sanguine, stimuler la cellule B à libérer de l'insuline. En acceptant cette hypothèse, point de départ de cette thèse, nous nous sommes efforcés de mettre en évidence la réalité de cette stimulation par différents substrats alimentaires agissant sur la muqueuse duodénale du rat, et de comprendre le mécanisme déclenché par la nourriture, grâce à l'emploi de produits non métabolisables ou inhibant la synthèse protéique. Un chapitre de ce travail parlera d'un essai de purification de ce ou de ces facteurs intestinaux.

* * *

III - MATERIEL ET METHODES

1. DOSAGES-PROVENANCES DES PRODUITS

La provenance des différents produits utilisés est indiquée au tableau 1. Les dosages faits au cours de ces expériences sont principalement celui de l'insuline, ceux des substrats alimentaire ou de leur métabolites : glucose, acides aminés, acides gras libres, etc.

Le dosage radioimmunologique de l'insuline a été mis au point par Yalow et Berson (1960). Nous avons repris cette méthode modifiée selon Hales et Randle (1963), en utilisant de l'insuline de rat (Novo, Copenhague) comme référence.

Essai : La courbe de référence se fait en triplicata alors que les échantillons se font en duplicata. Une préincubation de la suspension de l'anticorps précipité par de l'anti-g-globuline avec son antigène (insuline), 6h à 4° C est suivie de l'adjonction de 0,1 ml d'insuline I^{125} dans chaque tube.Après 18 heures à 4° C, les tubes sont centrifugés à froid 15 minutes à 3500 g;le complexe anti-g-globuline-anticorps-insuline précipite. Le surnageant est prélevé par aspiration. La radioactivité des culots (cpm) permettra de lire sur la courbe de référence

Tableau 1 . PROVENANCE DES DIFFERENTS PRODUITS

Insuline cristallisée de rat	Novo,Copenhagen,lot R 171
Anticorps anti-insuline	Welcome ,Angleterre
Insuline marquée à l'iode^{125}	CIS Italie
Glibenclamide	Hoechst Francfort
Actinomycine D lot 2673	Lyovac Cosmogen MSD (N.Jersey)
Sécrétine	Boots,Angleterre,lots 64,98 et 121
	GIH,Suède,lot 27461
	Hoechst,RFA.lot 069 op 3
Gastric inhibitory peptide	Hoechst RFA
Cholécystokinine-pancréozymine	GIH,Suède lot 27461
Nesmida par voie buccale	Nestlé,Vevey
Albumine bovine	Armour pharmaceutical Co,Angleterre
L-arginine CHR (puris.)	Fluka n° 11010
L-lysine crist. (purum)	Fluka n° 62840
Ac.palmitique (puris.)	Fluka n° A 56461
D(+) glucose (puris.)	Fluka n° 49140
Glycérol (p.anal.)	Merck n° 4094
2-désoxy-D-glucose (p.us bioch.)	Merck n° 12124
Porous glass adsorbent (Vicor)	Corning & Co n°7235 lot 8149

ce les quantités d'insuline de chaque échantillon.

La liaison moyenne de l'antigène avec son anticorps est de 57,4 ± 1,4 % et l'interception à 50 % de 68,5 ± 2 µU / ml (moyenne de 28 courbes), (Tableau 2). Un pool de plasma de rats a été ajouté à chaque essai pour contrôler la reproductibilité du dosage;. des essais de dilution ou de mélange de plasma ont également prouvé la valeur de la méthode employée.

Il ne semble pas, ainsi que l'ont démontré Feldman et coll. (1973), que les acides aminés ou l'héparine aient une influence sur le dosage radioimmunologique de l'insuline.

Le glucose a été déterminé par la méthode de Hultman (1965) modifiée par Dubowski (1962). Basée sur la réaction colorée des alcools aldéhydiques (aldoses) en présence d'O-toluidine dans l'acide acétique glacial, cette méthode est rapide et précise; elle n'est surpassée en qualité que par des méthodes enzymatiques plus délicates et plus onéreuses.

Les acides gras libres ont été extraits par le chloroforme et dosés par voie colorimétrique. Les réactifs et solutions pour ces dosages proviennent de la maison Boehringer (Duncombe 1963).

L'arginine libre a été dosée par chromatographie en phase gazeuse au laboratoire de recherche de la maison Nestlé à la Tour-de-Peilz.

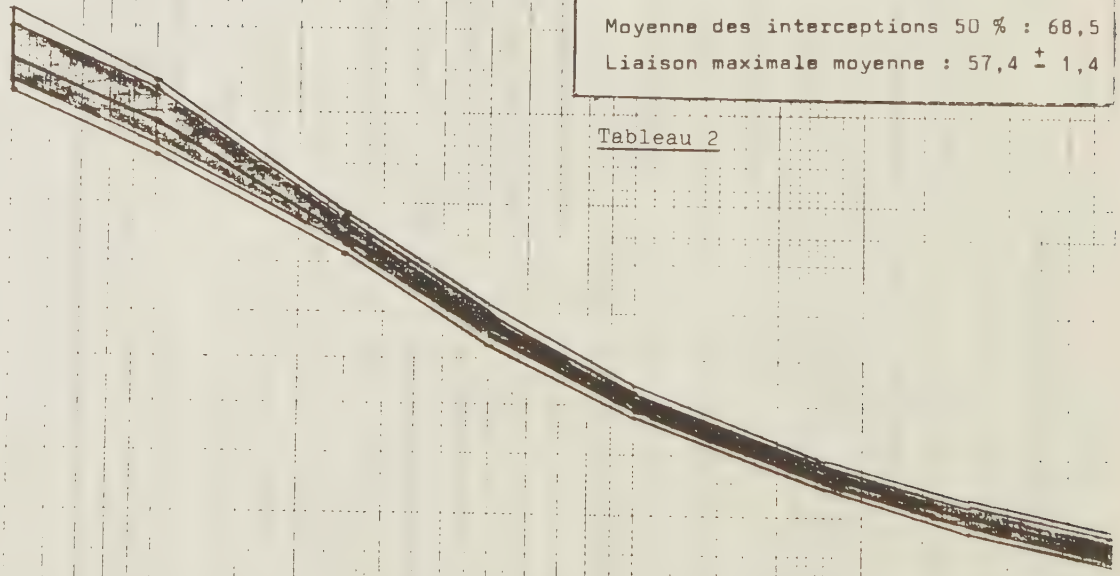
La composition du Nesmida (hydrolysat de lactalbu -

MOYENNE DE 28 COURBES AVEC LES
LIMITES DE CONFIANCE : 95 %
99 % :

Moyenne des interceptions 50 % : 68,5

Liaison maximale moyenne : $57,4 \pm 1,4$

Tableau 2



mine) nous a été fournie par la même maison (tableau 3 A) celle de l'huile d'arachide par la maison SAIS (tableau 3 B).

Tableau 3 . A *Répartition des acides aminés indispensables dans le Nesmida.*

Lys	: 9,82 %	*Val*	: 5,05 %	*Meth*	: 2,37 %
Arg	: 3,11 %	*Leu*	: 11,6 %	*Ileu*	: 5,52 %
Thr	: 5,05 %	*Phe*	: 3,44 %	*Try*	: 1,60 %

B *Répartition de acides gras dans l'huile d'arachide (SAIS).*

C 12	: traces	*C 18*	: 3 %
C 14	: traces	*C 18 '*	: 41 %
C 16	: 15,5 %	*C 18 ''*	: 34,5 %
C 16 '	: 0,5 %	*C 18 '''*	: traces

2. ANIMAUX

Les expériences relatées dans ce travail ont été faites en partie chez l'homme, mais surtout chez le rat.

Le rat d'ailleurs est un animal de laboratoire de choix et seul l'homme le dépasse dans la fréquence des expériences sur des êtres vivants. Ce rongeur offre de nombreux avantages, dont une résistance légendaire aux infections et traumatismes divers (opérations, jeûne...), une taille réduite facilitant son entretien et sa manipulation, la possibilité de s'en procurer en grande série et à peu de frais. De plus l'existence de souches pures permet, lors de l'emploi de petites séries, une comparaison valable des résultats.

Pourtant le mode de nutrition, les caractéristiques métaboliques ainsi que la différence morphologique de ses organes, font que cet animal est assez éloigné de l'homme, champ d'application final de toute recherche médicale. Ainsi, le pancréas du rat est un organe diffus, fait de lobes sécréteurs séparés. Il n'existe pas de canal excréteur distinct : les lobes pancréatiques se déversent dans le canal cholédoque qui prend la fonction de canal pancréatico-biliaire (Fig. 2).

A. Provenance : C'est par le croisement répété de rats albinos

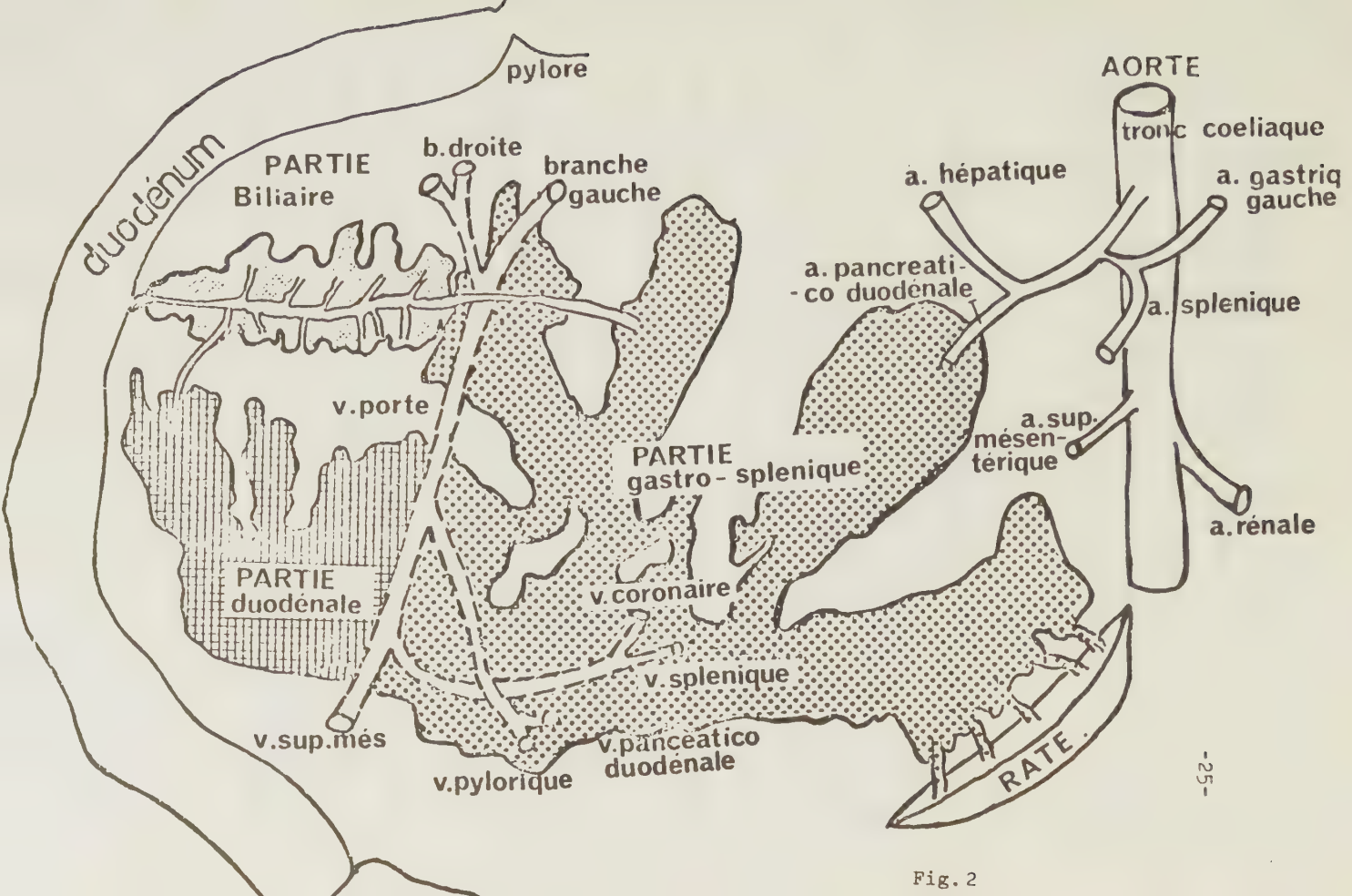

pylore
duodénum
PARTIE
Biliaire
b.droite
branche
gauche
v.porte
PARTIE
duodénale
PARTIE
gastro - splenique
v.coronaire
v.splenique
v.sup.més
v.pylorique
v.panceatico
duodénale
RATE
AORTE
tronc coeliaque
a. hépatique
a. gastriq
gauche
a. pancreati-
-co duodénale
a. splenique
a.sup.
mésen-
térique
a.rénale

Fig. 2

entre eux et le rejet systématique de tout porteur de caractères différents, qu'ont été obtenues des lignées où chaque animal possède un bagage génétique pratiquement identique. Les animaux, de race WISTAR et de souche "inbred" nous sont fournis par l'Institut de physio-pathologie de l'Université de Berne.

Age : Les rats utilisés sont en fait choisis selon des critères de poids plus que d'âge. Vers 5 mois ils pèsent environ 300 g et c'est à ce poids qu'on les utilise.

Sexe : Afin d'éviter les variations métaboliques dues à un état gravide et aux différentes périodes du cycle, ce sont exclusivement des mâles qui ont été utilisés pour toutes les expériences.

Jeûne : Les animaux sont nourris habituellement avec des granulés composés de façon équilibrée de glucides, de lipides et de protéines. Pour limiter le stimulus de la nourriture sur la muqueuse duodénale au seul composant étudié, ces animaux doivent avoir un tube digestif vide. Un jeûne de 24 heures est suffisant pour vider estomac et intestin grêle. Comme le rat mange sans cesse mais principalement la nuit, il suffit d'enlever la nourriture la veille après-midi pour obtenir le lendemain matin des animaux à jeun. De l'eau leur est fournie ad libitum.

Narcose : La narcose des animaux a été obtenue par le pento-

barbital sodique (Nembutal-Abott). Les animaux sont pesés ($\pm$ 5 g) et reçoivent par voie intrapéritonéale du Nembutal à raison de 0,15 ml/ 100 g (7,5 mg Pentobarbital Na). Si l'injection est bien faite, les animaux dorment au bout de 10 minutes.

B. LA STIMULATION DE LA MUQUEUSE DUODENALE

Nous avons introduit différents aliments dans le tube digestif de l'homme ou du rat, afin d'observer leur action sur une activité bêtacytotrope de la muqueuse duodénale : cette activité a été baptisée DIRA pour Duodenal Insulin Releasing Activity.

Pour faciliter l'administration des aliments et pour améliorer leur contact avec la muqueuse, ceux-ci sont donnés sous forme de solution aqueuse.

Les solutions : Les solutions ont été préparées d'après les résultats obtenus dans l'étude d'absorption faite chez le rat par Zaragossa et Felber en 1972. Du glucose, du 2-désoxy-D - glucose, du Nesmida (hydrolysat de lactalbumine), de la lysine, de l'arginine et du glycérol ont été administrés à raison de 2 g/kg, en solution à 20 g / 100 ml. L'huile d'arachide a été mise en émulsion à l'aide d'un générateur à ultrasons

dans les mêmes proportions. L'acide palmitique a été transformé en palmitate (Bringolf et coll., 1972), puis dissous à chaud à raison de 8 g / 100 ml, solubilité maximale dans l'eau. La solution de contrôle pour les acides gras libres (176 mg / 1) a été préparé selon la méthode décrite par Zaragossa et Felber (1969). Le glibenclamide a été administré per os à raison de 5 mg dissous dans 50 ml d'eau.

Muqueuse duodénale humaine : Les sujets, à jeun depuis la veille, avalent une sonde à aspiration-section (Charles Debray) qui permet des prises successives de fragments de muqueuse, de l'ordre de 10 mg environ. Après localisation de cette sonde dans le duodénum, par radioscopie, (Fig. 3), on prélève la muqueuse en même temps que du sang dans une veine du bras ; ces deux prélèvements donnent les valeurs 0. Le sujet boit ensuite la solution à étudier et l'on compte le temps des prélèvements ultérieurs (muqueuse et sang) à partir de la fin de l'ingestion de la solution.

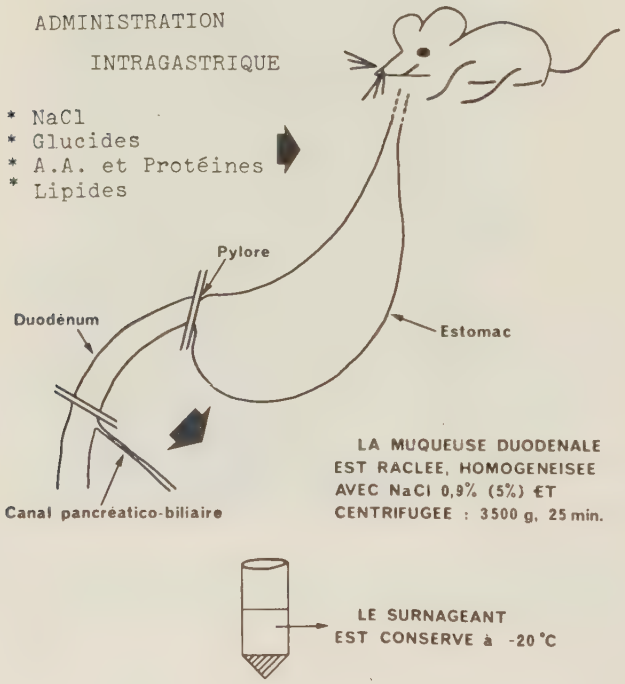
Les prélèvements de la muqueuse et du sang sont ensuite effectués à 15, 30, 45, 60 et 90 minutes après l'ingestion de la solution ; ils durent généralement de 1 à 3 minutes. Les fragments de muqueuse sont immédiatement lavés avec une solution physiologique, puis pesés et homogénéisés avec 100 fois leur poids de cette même solution à 4°. Ils sont ensuite centrifugés (20 min. à 3500 g) et le surnageant conser-

Muqueuse de rat : Après l'administration de la solution par sonde gastrique les rats sont tués par fracture cervicale aux temps 5, 15, 30, 45, 60 et 90 minutes. On les ouvre alors du

Fig. 3 : *Localisation radiophotographique de la sonde à biopsies dans le duodénum (d 2).*

bassin au sternum, et l'on excise le duodénum en prenant garde de ne pas prélever de graisse ou des lobules de pancréas. Nous avons utilisé la partie du duodénum qui se situe entre le pylore et le canal pancréatico-biliaire, deux repères faciles à trouver (Fig. 4). Ces fragments de duodénums sont lavés

Fig. 4 : Le rat donneur de muqueuse.



avec 20 ml de solution isotonique puis ouverts dans la longeur et la face interne, la muqueuse, est raclée avec un scalpel. Cette muqueuse est alors pesée ($\pm$ 1 mg) puis homogénéisée avec 10 fois son poids de NaCl 0,9 %. L'homogénat est centrifugé à 3500 g pendant 20 minutes puis réparti par fractions de 600 microlitres dans des tubes mis à congeler (- 20° C). Toutes ces opérations se font rapidement et sur la glace.

C. L'ESSAI BIOLOGIQUE CHEZ LE RAT

Pour vérifier les variations de l'activité insulinotrope du ou des facteur(s) de la muqueuse duodénale, nous avons adapté la méthode mise au point par Hadjikahni. Elle constitue notre essai biologique appelé essai "RAT RECEVEUR".

Après narcose au pentobarbital (voir détail plus haut), les rats à jeun sont fixés sur le dos. On incise latéralement jusqu'à la base des côtes. Après contrôle de la vacuité de l'estomac et de l'intestin grêle, on dégage sur la gauche de l'animal l'aorte et le tronc coeliaque (Fig. 5). On déplace ensuite l'intestin et l'estomac et l'on introduit une aiguille (0,9 x 55 mm) munie d'un tuyau fin de polyéthylène (Pe 90) dans la veine porte, en pénétrant par la veine mésentérique supérieure.On vérifie alors que le sang coule bien dans le cathéter et l'on injecte 0,3 ml d'une solution

de NaCl 0,9 % contenant quelques gouttes de liquémine par litre, employée comme liquide de remplacement. Le rat est laissé dans cette position pendant 10 minutes, dans le but de stabiliser la préparation et d'éviter tout excès sécrétoire dû à la manipulation. Nous avons choisi un temps de 10 minutes après avoir prélevé dans la veine porte de rats

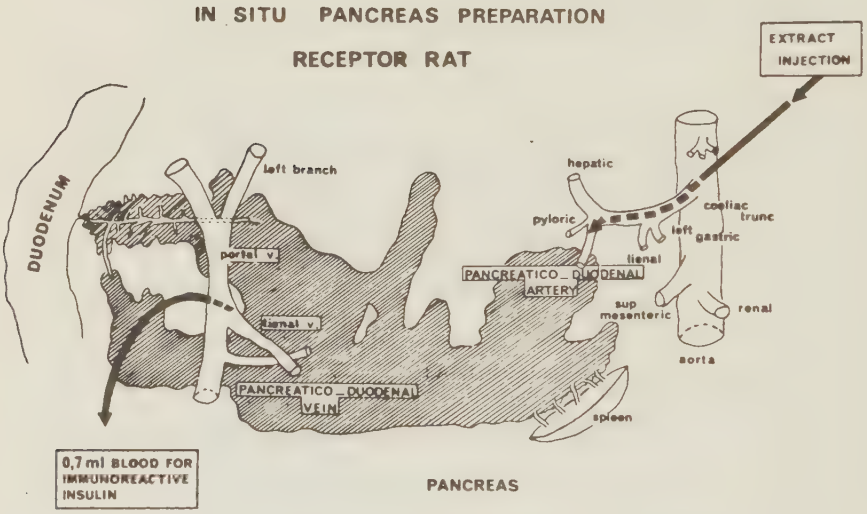


Fig. 5 : Le rat receveur - Schéma de l'injection de l'extrait et de de la prise portale de sang

préparés comme décrit ci-dessus, 0,4 ml de sang pendant 30 minutes à des intervalles de temps définis (Fig. 6). L'insulinémie s'est montrée à peu près stable 10 minutes après le début de l'opération chez les animaux présentant à ce temps des valeurs d'insuline inférieures à 100 µU / ml. De ce fait, nous n'avons pas tenu compte des rats dont l'insulinémie était su-

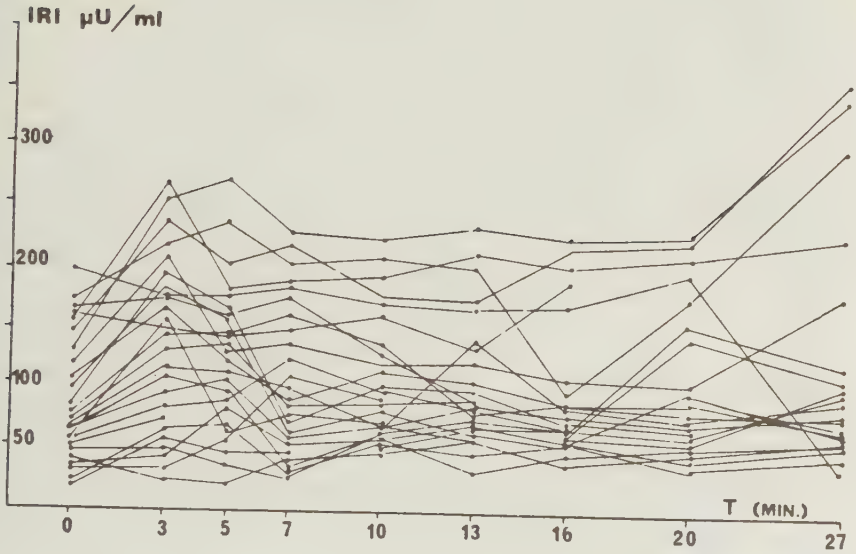


Fig. 6 : Variations au cours du temps de l'insulinémie portale du rat receveur.

périeure après 10 minutes à 100 µU / ml.

Les extraits, décongelés lentement et gardés sur glace, sont répartis par fractions de 200 microlitres pour l'injection. Après 10 minutes d'attente, nous prélevons de la veine porte en 15 à 20 secondes 0,7 ml de sang, qui sont gardés sur glace avec 1 goutte de liquémine 1/10. Avec une aiguille de 0,33 mm munie d'un cathéter fin (Pe 50), nous pénétrons dans l'aorte au-dessus du tronc coeliaque, pour passer dans celui-ci assez profondément, jusqu'à l'embranchement des artères hépatique et gastroduodénale (ou pancréatico-duodénale supérieure) (Fig. 7).

Nous injectons 0,2 ml de l'extrait, mettons le chronomètre en marche et nous replaçons l'aiguille dans l'aorte, de façon à permettre une irrigation normale du pancréas. L'injection se fait en 8 à 10 secondes ; 1 minute exactement après la fin de l'injection nous prélevons par le cathéter portal à nouveau 0,7 ml de sang ; ces prélèvements sanguins sont répétés 5, 10 et 15 minutes après l'injection. Le sang est ensuite contrifugé et le plasma congelé.

Comme le sang venant du pancréas contient jusqu'à 15 fois plus d'insuline que celui de la veine mésentérique, on peut objecter que leur mélange, qui varie selon l'endroit de la prise de sang est source d'erreurs. Le fait de poser l'aiguille directement dans la veine pancréatico-duodénale ré-

Fig. 1

soudrait ce problème d'imprécision dans le mélange des sangs mais provoquerait une congestion du pancréas. La méthode utilisée, tout en présentant certaines imperfections, donne cependant des résultats reproductibles. Avec un collectif de 1384 rats, on obtient une valeur moyenne de base de 61,3 µU / ml avec un écart type sur la moyenne de ± 0,4 µU / ml.

* * *

3. VERIFICATIONS ET CONTROLES

Avant d'aborder l'étude de l'action des différents aliments sur l'activité duodénale insulinotrope (DIRA), nous nous sommes assurés que la réponse obtenue chez le rat receveur traduisait bien les variations quantitatives ou qualitatives du stimulus alimentaire appliqué et ne résultaient pas des diverses manipulations.

Hadjikahni et coll. ont tenté de ligaturer chez le rat receveur les artères hépatique, splénique et coronaire stomachique avant l'injection de diverses quantités de sécrétine Boots, pour forcer cette hormone à ne passer que par l'artère pancréatico-duodénale. L'injection de 2 unités de cette sécrétine chez des rats receveurs avec ou sans ligature a montré que cette opération augmentait notablement le taux de base d'insuline sans améliorer la réponse du pancréas à l'injection (Tableau 4). C'est la raison pour laquelle ces ligatures ont été abandonnées au profit d'une nouvelle manière d'injecter l'extrait : celui-ci, au lieu d'être injecté au début du tronc coeliaque est injecté plus bas, à l'embouchure de l'artère pancréatico-duodénale, ce qui rend inutiles les ligatures splénique et coronaire stomachique, comme le montrent les résultats de l'injection du même extrait obtenus à plus

Tableau 4 .

A - Comparaison, chez deux séries de rats, de la libération d'insuline après l'injection de deux unités de sécrétine (Boots). Une ligature des artères splénique, hépatique et coronaire stomachique a été effectuée dans la première série d'animaux.

Temps de la prise de sang (minutes) :	0	1	5	10	15
Avec ligature - IRI en uU / ml :	153	185	100	154	146
Ecart type de la moyenne (5 rats) :	61	53	29	48	51
Sans ligature - IRI en uU / ml :	109	272	232	175	110
Ecart type de la moyenne (4 rats) :	35	85	47	59	34

B - Comparaison des valeurs d'insuline obtenues chez le rat receveur après l'injection d'extraits de muqueuse duodénale de rats donneurs, sacrifiés 45 minutes après l'administration de glucose par voie orale.

Valeurs d'insuline (uU / ml) 1 minute après l'injection

490 ± 79	12 rats	1972
487 ± 142	7 rats	1973
461 ± 128	7 rats	1974

de deux ans d'intervalle (Tableau 4 B).

Pour vérifier si la réponse d'insuline correpond au stimulus appliqué,différentes hormones gastro - intestinales décrites comme stimulatrices de la cellule B du pancréas,ont été injectées, en quantité variable, chez le rat. Ces injec - tions nous ont permis en quelque sorte "d'étalonner" notre essai biologique du rat receveur. Nous avons injecté tout d'abord de la sécrétine Boots, de préparation assez grossière, à raison de 1, de 5 et de 20 unités cliniques(Tableau 5). La réponse d'insuline obtenue à la suite de ces injections a varié suivant la dose injectée : faible lors de l'emploi de 1 unité de sécrétine, elle devient forte avec 5 unités et maximale avec 20 unités de ce produit.

Plusieurs auteurs ont récemment mis en doute l'action insulino-libératrice de la sécrétine pure (Turner 1969, Vagne et coll. 1972) ; nous avons étudié l'effet insulinotrope chez le rat receveur d'une sécrétine hautement purifiée (GIH,Karolinska Institut), et d'une sécrétine synthétique (Hoechst). Ces deux produits ont été injectés à raison de 20 unités cliniques uniquement, quantité qui induisait une réponse maximale de la cellule B lors de nos essais avec la sécrétine Boots. Nous n'avons obtenu avec ces deux sécrétines qu'une libération d'insuline très faible, que nous ne pouvons pas distinguer de celle obtenue en injectant une solu-

Tableau 5 . Variations de l'insulinémie portale chez le rat receveur après l'injection de diverses quantités de sécrétine Boots.

t (min.) :	0	1	5	10
Sécrétine 1 U	34	36	34	65
	28	55	40	33
	31	130	45	34
	33	70	44	31
	33	64	37	34
	29	160	53	40
	39	220	74	40
	31	94	35	40
	29	38	38	58
$\bar{x} \pm$ etm	32 ± 1	96 ± 20	44 ± 4	42 ± 4
Sécrétine 5 U	47	39	60	47
	96	540	365	200
	47	350	110	54
	32	340	82	46
	33	245	68	58
	34	305	220	175
	33	98	43	45
	47	245	80	40
	34	330	275	310
$\bar{x} \pm$ etm	44 ± 7	276 ± 49	145 ± 38	108 ± 32
Sécrétine 20 U	125	230	88	175
	72	540	350	275
	80	420	375	270
	48	440	600	460
	58	420	700	540
	72	780	540	450
	76	540	550	420
	51	445	440	340
$\bar{x} \pm$ etm	80 ± 8	517 ± 63	445 ± 67	336 ± 43
NaCl 0,9 %	33	46	35	23
	56	30	45	22
	26	86	30	30
	26	40	42	28
	26	35	46	50
	33	38	84	48
	36	37	23	33
$\bar{x} \pm$ etm	33 ± 3	43 ± 6	41 ± 6	33 ± 3

Les valeurs d'insuline sont données en µU / ml, celles de sécrétine en unités cliniques (U).

tion de contrôle de concentration protéique identique (Fig.8). Cette observation nous a fait penser que la réponse d'insuline qui suivait l'injection de la sécrétine Boots était due à d'autres facteurs contenus dans cette préparation impure et non à la sécrétine elle-même.

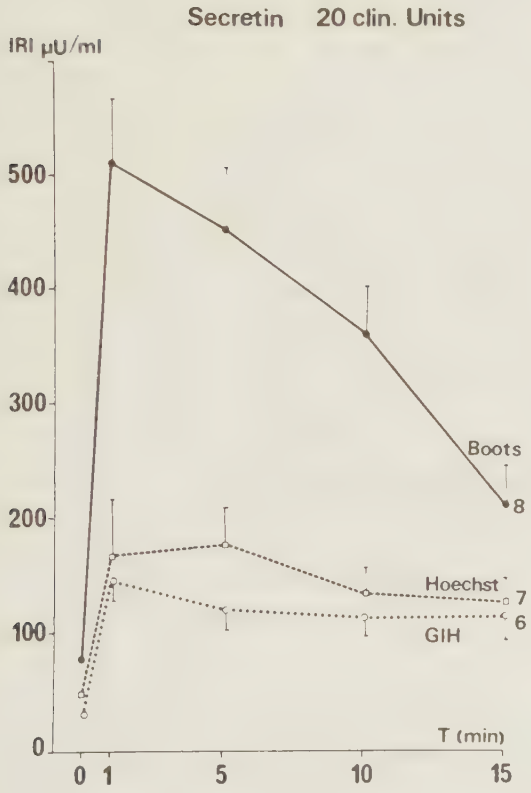


Fig. 8
Comparaison de l'activité insulinotrope de sécrétines de provenance diverse.

L'injection de cholécystokinine-pancréozymine (CCK-PZ) chez le rat receveur à raison de 10 unités cliniques par animal a provoqué une libération intense d'insuline (Fig. 9).

Comme l'ont décrit Rabinovitch et Dupré (1972), il est probable que ce soit le contenu en GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide) de cette préparation qui soit responsable

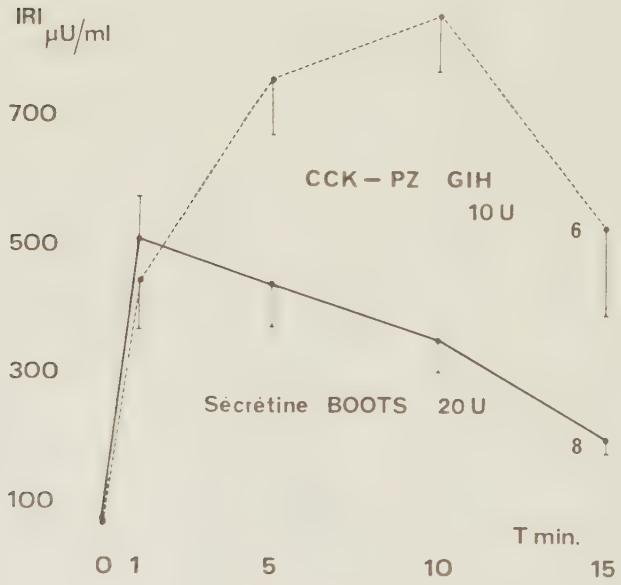


Fig. 9 Comparaison de l'activité insulinotrope de la sécrétine Boots et de la CCK-PZ de provenance du GIH institut.

de cette importante stimulation B.

C'est pourquoi nous avons vérifié les variations de l'insulinémie portale chez le rat receveur après l'injection de diverses quantités de GIP (Fig. 10). Ces variations

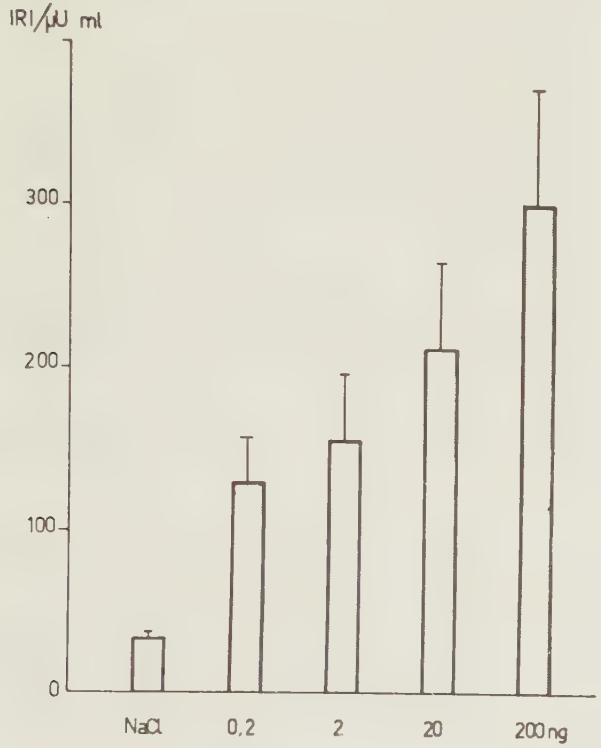


Fig. 10 Stimulation de la libération d'insuline chez le rat receveur par différentes quantités de Gastric Inhibitory Polypeptide.

sont significatives mais de faible amplitude; il est possible (Falko et coll. 1975) que le GIP n'agisse sur le pancréas de façon optimale que lorsqu'il est administré avec du glucose.

La libération d'insuline chez le rat receveur après l'injection de CCK-PZ, de sécrétine ou de GIP nous a permis de mesurer la réponse des cellules B du pancréas et de comparer ainsi les stimuli appliqués. Nous nous sommes assurés ainsi que notre système rat-donneur/rat receveur pouvait être un moyen valable de recherche.

Dans le but de préciser l'action du contenu acide de l'estomac sur le DIRA, nous avons administré à des rats donneurs une solution physiologique par voie intragastrique. L'extrait de muqueuse prélevé 5 minutes plus tard ne s'est guère montré plus actif sur la cellule B que celui provenant de rats à jeun (Fig. 11).

Afin de vérifier si le fait d'utiliser des rats à jeun pouvait modifier le contenu de la muqueuse duodénale en activité insulinotrope, nous avons mesuré le DIRA dans la muqueuse de rats nourris. Les rats utilisés pour cette expérience ont eu libre accès à leur nourriture habituelle la veille de l'expérience. Leur muqueuse duodénale, prélevée en même temps que les muqueuses de rats à jeun, a montré une activité insulinotrope significativement plus faible que cel-

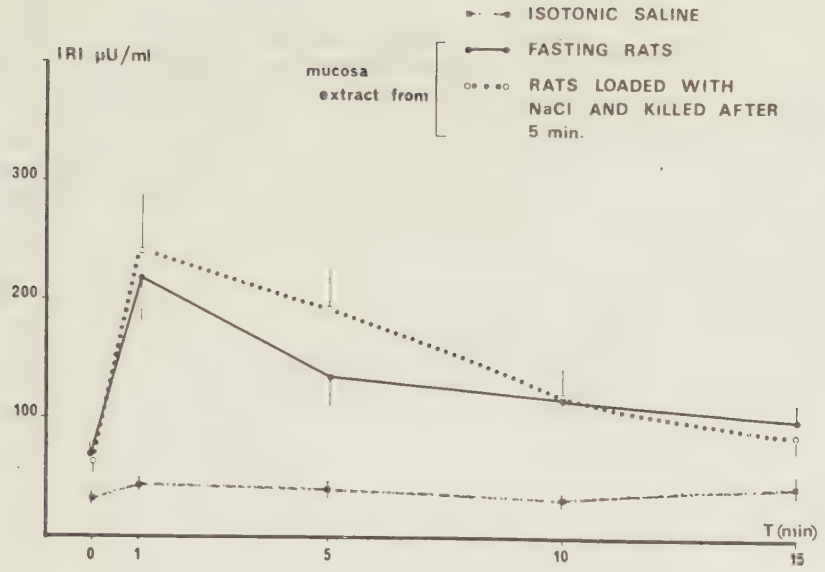


Fig. 11 Réponse en insuline du rat receveur à l'injection de différents extraits.

le de ces derniers (Fig. 12).

Des essais d'injection d'extrait de muscle abdominal humain (Hadjikahni et coll. 1970), d'extrait de muqueuse du gros intestin de rat (Dick, 1975) ou d'extrait de muqueuse iléale, ont montré la spécificité de la muqueuse duodénale dans son action sur le pancréas. Une activité insulinogénique

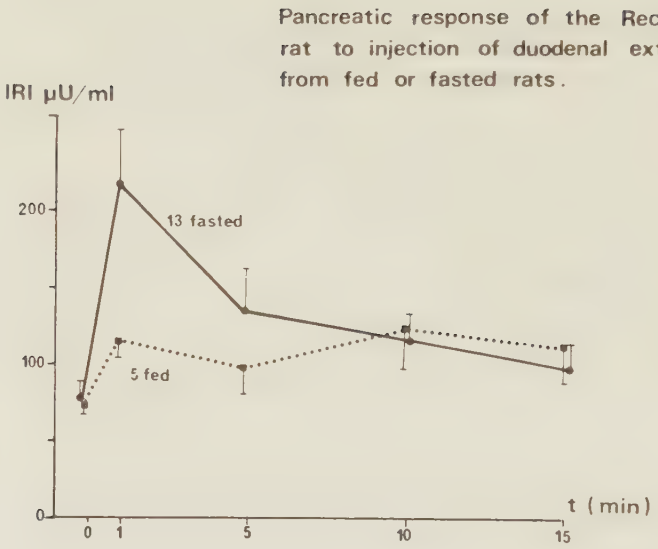


Fig. 12 : Comparaison de l'activité insulinotrope d'extraits de muqueuse duodénale provenant de rats nourris ou à jeun.

significative, mais de moindre amplitude, a pourtant été observée dans la partie supérieure du jéjunum ainsi que nous le montre le tableau 5 B.

Tableau 5 B . Variations portales de l'insulinémie chez le rat receveur lors de l'injection d'extraits de muqueuse de jéjunum ou d'iléon de rats donneurs sacrifiés 45 minutes après l'administration intragastrique de glucose.

Temps (minutes)	:	*0*	*1*	*5*	*10*
Jéjunum (IRI uU / ml)	:	*78*	*341*	*207*	*210*
Ecart type de la moyenne (8 rats)	:	*17*	*77*	*58*	*39*
Iléon (IRI uU / ml)	:	*14*	*132*	*61*	*41*
Ecart type de la moyenne (5 rats)	:	*2*	*57*	*20*	*12*

* * *

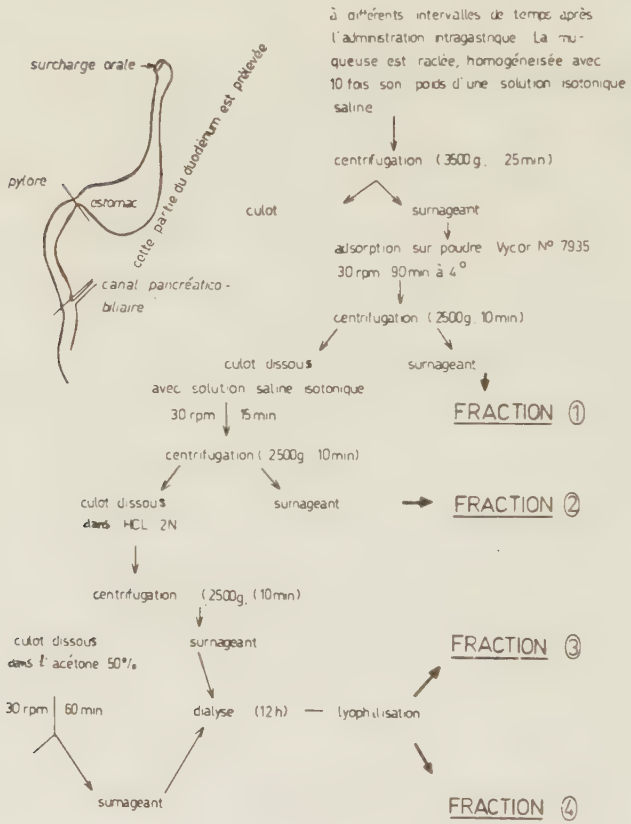
4. METHODE DE PURIFICATION

Nous avons choisi une technique de purification pour petits peptides à partir de liquides physiologiques (Ratcliffe et coll 1970) après avoir accepté l'hypothèse de la constitution peptidique du DIRA. Cette méthode utilisée pour l'adrénocorticotrophine (ACTH) est basée sur le principe de l'adsorption du polypeptide sur un verre synthétique poreux agissant à la fois comme tamis moléculaire et comme adsorbant. Cette adsorption est fonction de différentes propriétés physico-chimiques dont la solubilité, la polarité, la stabilité et le poids moléculaire. Des molécules de PM 1000 (oxytocine) à 21'000 (hormone de croissance) sont adsorbées avec une certaine efficacité qui est maximale pour les particules d'un poids moléculaire d'environ 5000.

Technique :

L'extrait aqueux provenant de duodénum de rats donneurs est aussitôt mis en présence de poudre Vicor en diverses quantités par ml d'extrait : 90,8 , 111 , 133,2 et 200 mg . L'adsorption a été facilitée par le mélange de la poudre Vicor et de l'extrait sur table tournante pendant 90 minutes à 4° C (Fig.13).

Fig. 13 : Schéma de la méthode de purification.



Le lavage avec une solution isotonique a pour but de décrocher les impuretés qui ne sont fixées ni par leur charge ni par leur taille.

Le lavage avec de l'acide chlorhydrique libère les molécules chargées $(+)$ sans avoir d'action sur les peptides accrochés aux silicates : L'élution par l'acétone, en modifiant les liaisons hydrophobes qui confèrent la stabilité, décroche le peptide de la poudre de verre et le fait passer en solution. Le séchage à 56° C, dernière étape de la méthode originale, a été remplacé par une dialyse contre de l'eau physiologique à 4° pendant 12 heures, suivie d'une lyophilisation.

L'ACTH, par la méthode de Ratcliffe, est extraite à plus de 80 % ; elle conserve son activité immunologique et biologique.

* * *

5. EXPRESSION DES RESULTATS

Nous avons essayé de tester la qualité de nos résultats à l'aide des méthodes classiques d'analyse statistique. Ainsi, une moyenne arithmétique ($\bar{x}$) des valeurs (n) obtenues est calculée avec sa déviation standard de la manière suivante :

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

ou plus généralement avec l'écart type sur la moyenne :

$$etm = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

La comparaison de deux moyennes a été effectuée par le test de Student. Les seuils de confiance sont indiqués par la lettre p de la manière suivante : $p < 0,05$...

* * *

IV - RESULTATS

1. ETUDE DE L'EFFET DES GLUCIDES SUR L'ACTIVITE DUODENALE INSULINOTROPE (DIRA)

A. Le Glucose :

Le glucose est le composé chimique le plus largement utilisé dans les expériences de stimulation de la cellule B en raison de son rôle insulinotrope physiologique ; aussi l'avons nous choisi en premier lieu pour connaître son effet sur l'activité insulino-libératrice de la muqueuse duodénale.

Une série de rats donneurs a reçu par voie intragastrique 2 g de glucose par kg de poids corporel, sous la forme d'une solution aqueuse à 20 g / 100 ml. A des intervalles de temps donnés les animaux ont été décapités ; leur duodénum prélevés aussitôt ont servi à préparer un extrait aqueux testé chez le rat receveur pour connaître son activité insulino - libératrice.

Pour simplifier nous parlerons d'extraits 0, 5, 15, 30 minutes sans préciser chaque fois qu'il s'agit d'extraits

de muqueuse duodénale provenant de rats tués avant (= 0) ou 5, 15, 30 minutes après l'administration orale.

Les divers extraits duodénaux ont été comparés par la riposte d'insuline qu'ils produisent lorsqu'ils sont injectés dans le pancréas du rat receveur. Cette réponse de la cellule B est maximum 1 minute après l'injection de l'extrait ; en choisissant une seule valeur d'insuline pour mesurer l'activité insulinotrope d'un extrait,la valeur 1 minute, on rend possible une comparaison des résultats et on en simplifie la lecture. Ainsi, dans les graphiques nous indiquerons en abscisse le temps après lequel la muqueuse du rat donneur a été prélevée et en ordonnée la valeur d'insuline obtenue 1 minute après l'injection de l'extrait chez le rat receveur.

L'injection d'extraits de muqueuse duodénale de rats donneurs à jeun (extrait 0) a fait passer le taux basal d'insuline chez 13 rats receveurs de 69 ± 10 µU / ml à 219 ± 36 µU / ml 1 minute plus tard (Fig. 14 et Fig. 15). L'extrait de glucose 5 minutes (provenant de duodénums prélevés 5 minutes après l'administration intragastrique de glucose) a fait varier les taux d'insuline du rat receveur 1 minute après l'injection à respectivement 158 ± 20 µU / ml et à 110 ± 9 µU / ml. L'extrait glucose 45 minutes a élevé le taux basal d'insuline de 6 rats receveurs à 562 ± 33 µU / ml, 1 minute

après son injection. Les extraits glucose 60 minutes et glucose 90 minutes n'ont libéré après leur injection chez le rat receveur que respectivement 395 ± 67 et 294 ± 54 µU / ml 1 minute plus tard.

On constate, après la prise de glucose, une aug-

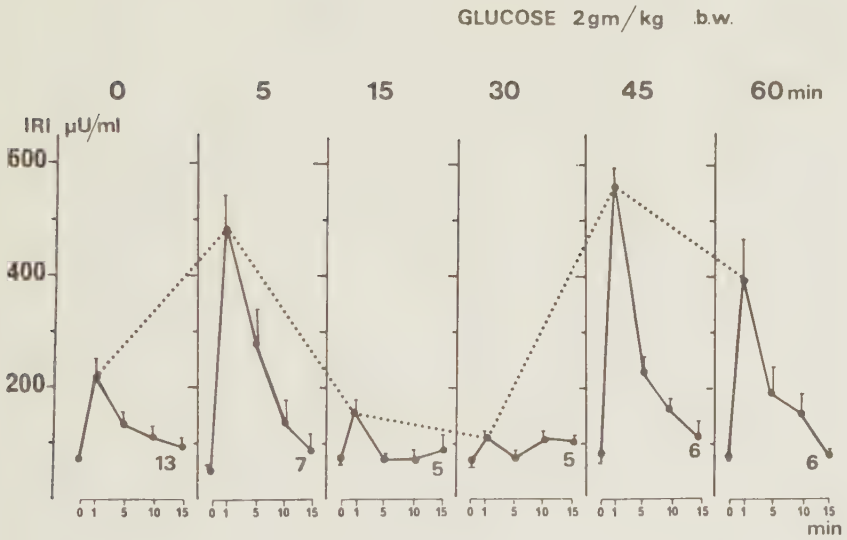


Fig. 14 : Variations de l'insulinémie du rat receveur au cours du temps (0 - 15 min.) lors de l'injection d'extraits de muqueuse duodénale provenant de rats sacrifiés à différents intervalles de temps (0 - 60 min.) après l'administration intragastrique de glucose.

mentation très rapide du DIRA dans la muqueuse duodénale (Fig. 15). Cette activité est de courte durée puisque l'extrait glucose 15 minutes en contient moins que l'extrait 0 et l'extrait glucose 30 minutes une quantité inférieure ($p < 0,05$) à celle de l'extrait 0. Cette première stimulation à

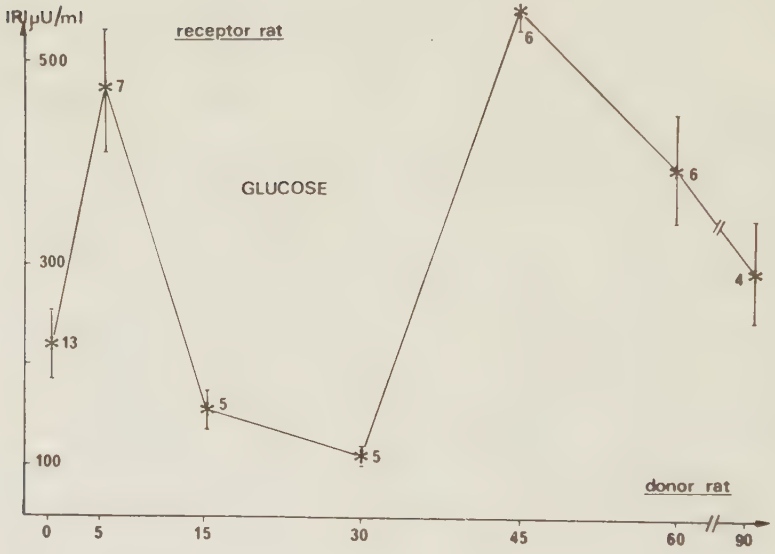


Fig. 15 : Variations de l'activité insulinotrope d'extraits de muqueuse duodénale de rats après l'administration de glucose dans l'estomac.

5 minutes est suivie d'une seconde stimulation à 45 minutes obéissant à une cinétique différente. En effet, l'extrait glucose 60 minutes, prélevé 15 minutes après l'extrait glucose 45 minutes est plus actif ($p < 0,01$) sur la cellule B que l'extrait glucose 15 minutes, prélevé 10 minutes après l'extrait glucose 5 minutes. L'extrait glucose 90 minutes est encore plus insulinotrope ($p < 0,01$) que l'extrait glucose 30 minutes, ce qui montre la différence de ces deux pics.

On a soupçonné le contenu en glucose des extraits d'être à l'origine de la stimulation B observée. Le dosage de ce sucre dans les extraits de muqueuse duodénale à différents intervalles de temps après l'administration de glucose a montré qu'on en trouvait le plus dans l'extrait 15 minutes, extrait qui est l'un des moins insulinotropes.De plus,(tableau 6) les extraits glucose 30 et glucose 45 minutes contiennent un taux de glucose pratiquement identique alors qu'ils possèdent une activité B différente ($p < 0,05$).

La quantité de glucose mesurée dans l'extrait 15 minutes (88 mg / 100 ml) a été injectée au rat receveur ; elle ne modifie pas son insulinémie basale. Le glucose contenu dans les extraits ne peut donc pas,à lui seul,être responsable de la stimulation B provoquée par leur injection.

Notons aussi que la concentration maximale de glucose trouvée dans les extraits de muqueuse duodénale est in-

Tableau 6 . Variation de la quantité de glucose et d'insuline contenus dans les extraits de muqueuse duodénale de rats, sacrifiés à différents intervalles de temps après l'administration intragastrique de glucose.

Temps (minutes) :	*0*	*5*	*15*	*30*	*45*	*60*
Glucose (mg / 100 ml) :	*11*	*45*	*88*	*82*	*82*	*38*
Insuline (µU / ml) :	*19*	*22*	*24*	*25*	*23*	*20*

férieure à celle que l'on mesure dans le plasma du rat normal (100 à 130 mg / 100 ml).

B. Variation du DIRA à des concentrations diverses de glucose

Afin de vérifier la réalité physiologique de la réponse du DIRA au glucose, nous avons administré par voie intragastrique au rat donneur, des quantités variables de glucose. Les quantités choisies ont été de 4 g, de 2 g, de 0,5 g et de 0,1 g par kg de poids corporel. Ces animaux ont été sacrifiés après un laps de temps déterminé, correspondant au premier pic.

En réduisant les quantités de glucose administré dans l'estomac du rat receveur nous avons obtenu un abaissement de l'activité duodénale insulinotrope (Fig. 16).

Il est également intéressant de remarquer que chez le rat donneur, à la suite de l'administration intragastrique de 4 g ou de 2 g de glucose, la glycémie,mesurée au niveau périphérique est sensiblement la même (respective-

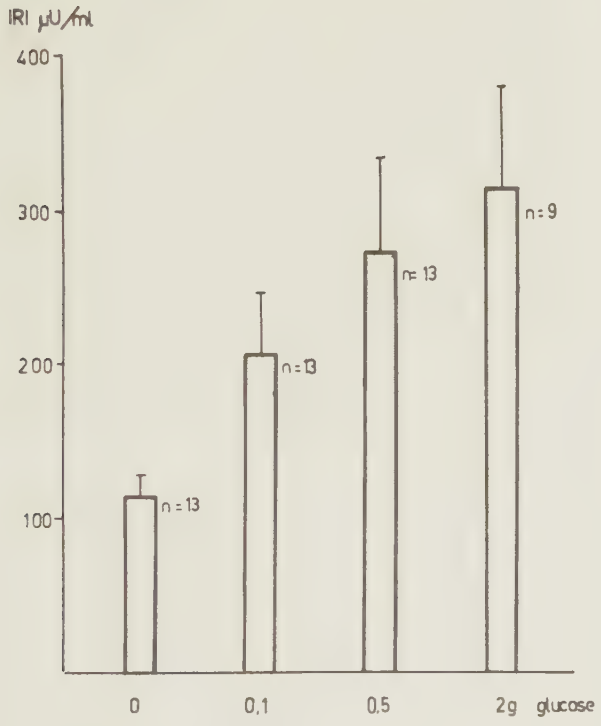


Fig. 16 : Variations de l'activité insulinotrope de la muqueuse duodénale du rat après l'administration intragastrique de diverses quantités de glucose.

ment 183 et 176 mg / 100 ml) alors que l'insulinémie varie du simple au double : 244 µU / ml pour 4 g et 128 µU / ml pour 2 g de glucose.

* * *

2. ETUDE DE L'EFFET DES PROTEINES ET ACIDES AMINES SUR L' ACTIVITE DUODENALE INSULINOTROPE

Les glucides ne sont pas la seule catégorie d'aliments qui peuvent exercer une influence sur le duodénum, ou sur les hormones gastro-intestinales et à travers elles, sur la sécrétion d'insuline. Raptis et coll. (1973) ont montré que l'administration intraduodénale d'acides aminés augmente la libération d'insuline, plus que l'injection de ces mêmes acides aminés. Il était donc intéressant de vérifier l'action de quelques acides aminés ou de petits peptides sur l'activité duodénale insulinotrope.

A. Expérience avec le Nesmida :

Les acides aminés isolés ne constituent que rarement sous cette forme un apport alimentaire : c'est en tant que protéines ou petits peptides que ceux-ci sont généralement fournis à l'organisme. Nous avons commencé nos expériences avec le Nesmida, un hydrolysat partiel de lactalbumine, dont la composition est donnée au chapitre Matériel et Méthodes.

Une série de rats donneurs de muqueuse a reçu dans l'estomac 2 g par kg de poids corporel d'une solution à 20 g

de Nesmida dans 100 ml. La muqueuse de ces rats, prélevée à des temps déterminés après l'administration, a stimulé de façon peu importante la libération d'insuline (Fig. 17).

Aucune des valeurs d'insuline obtenues 1 minute après l'injection des extraits Nesmida n'est vraiment différente de celles obtenues après l'injection de l'extrait 0 .

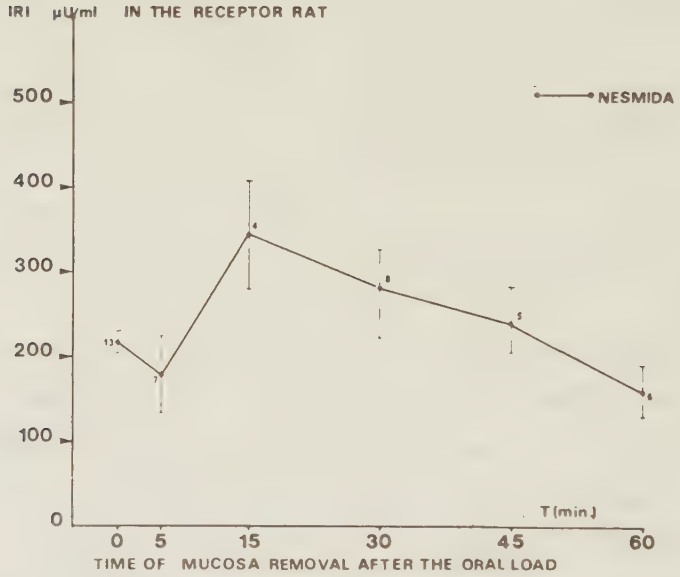


Fig. 17 : Variations de l'activité duodénale insulinotrope du rat après l'administration intragastrique de Nesmida.

L'extrait Nesmida 15 minutes est pourtant sensiblement plus actif sur les cellules B que l'extrait O ou que l'extrait Nesmida 5 minutes.

Pour préciser chimiquement le stimulus appliqué et pour supprimer un éventuel retard de la réponse duodénale dû à l'hydrolyse des peptides du Nesmida en acides aminés, nous avons administré au rat donneur des acides aminés isolés.

B. Expérience avec l'arginine

L'arginine, acide aminé basique gluco-formateur indispensable, a été administré par voie intragastrique chez le rat à raison de 2 g par kg de poids corporel, sous forme de solution à 20 g par 100 ml. Les animaux sacrifiés à des temps déterminés ont fourni un extrait de muqueuse duodénale qui a été injecté chez le rat receveur pour en vérifier l'activité insulinotrope (Fig. 18).

On observe 5 minutes après l'administration d'arginine une augmentation importante et significative ($p < 0{,}001$) de l'activité duodénale insulinotrope : de 219 $\pm$ 36 pour la muqueuse à jeun, à 577 $\pm$ 41 µU / ml pour la muqueuse arginine 5 minutes. Cette augmentation est comparable à celle observée au même temps après l'administration de glucose. Nous avons obtenu ensuite une chute de l'activité duodénale insulinotrope

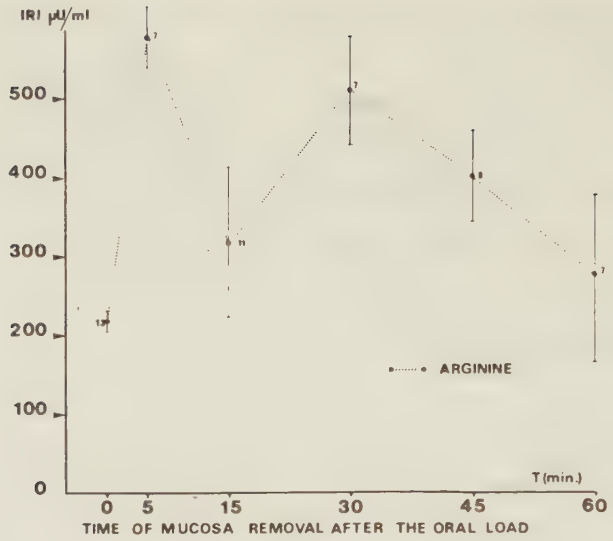


Fig. 18 : Variations de l'activité duodénale insulinotrope du rat après l'administration intragastrique d'arginine.

à 15 minutes puis un second pic avec la muqueuse prélevée trente minutes après l'administration intragastrique d'arginine. Les variations du DIRA après l'arginine donnée par voie orale se présentent d'une façon biphasique, comme celles que nous avons observées après le glucose, même si les temps réels, qui dépendent de la vidange gastrique, ne coïncident pas.

Pour écarter l'éventualité d'une action directe de

l'arginine sur la cellule B dans la réponse observée, nous avons mesuré le contenu en arginine des différents extraits de muqueuse duodénale (Tableau 7). Dans l'extrait provenant de rats tués 5 minutes après l'arginine, nous avons mesuré une concentration de 33 mg / 100 ml de cet acide aminé. C'est cette concentration maximale qui a été injectée chez le rat receveur. La libération d'insuline qui s'en est suivie fut inférieure ($p < 0,001$) à celle qui a été obtenue en injectant

Tableau 7 . Variation de la quantité d'arginine contenue dans les extraits de muqueuse duodénale provenant de rats sacrifiés à différents intervalles de temps après l'administration d'arginine par voie intragastrique.

Temps (minute) :	*0*	*5*	*15*	*30*	*45*	*60*
Arginine (mg / 100 ml) :	*21,2*	*33,3*	*22*	*21,6*	*26,6*	*20*

l'extrait arginine 5 minutes (Tableau 8). L'arginine contenue dans les extraits ne semble donc pas être responsable à elle seule de la libération d'insuline observée lors de l'injection de ces extraits.

Tableau 8 . Variations portales de l'insulinémie de 5 rats receveurs après l'injection de 33 mg d'arginine dissous dans 0,2 ml de solution physiologique.

Temps (minute)	:	*0*	*1*	*5*	*10*	*15*
Insuline (µU / ml)	:	*71*	*169*	*106*	*67*	*59*
Ecart type de la moyenne	:	*17*	*27*	*10*	*9*	*16*

C. Expérience avec la lysine

La lysine est un acide aminé indispensable céto- et gluco-formateur. Par voie veineuse cet acide aminé stimule la libération d'insuline de façon nettement moins prononcée que l'arginine. Une série de rats donneurs de muqueuse a reçu par voie intragastrique de la lysine à raison de 2 g par kg de poids corporel sous la forme d'une solution à 20 g dans 100 ml. Ces animaux ont ensuite été sacrifiés à différents intervalles de temps et leur muqueuse prélevée pour en déterminer le contenu en activité duodénale insulinotrope.

A aucun moment nous avons observé une variation significative de la réponse en insuline à l'injection de ces ex-

traits (Fig. 19). La lysine semble dépourvue d'une action insulino- libératrice par l'intermédiaire du tube digestif.

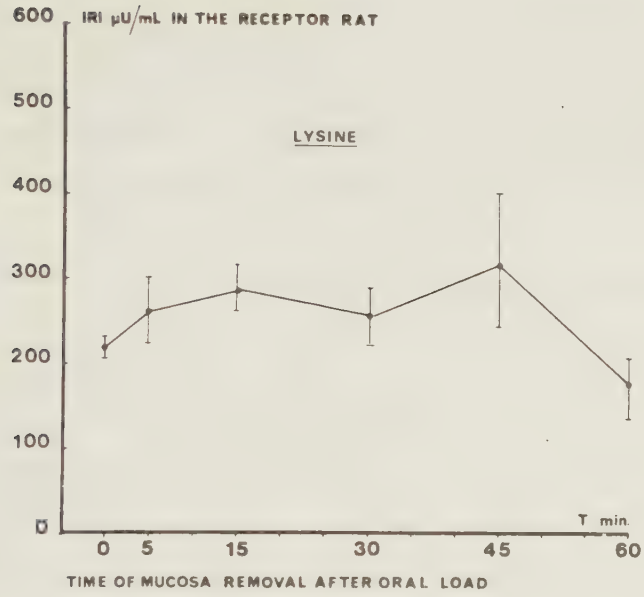


Fig. 19 : Variations de l'activité duodénale insulinotrope de rats recevant de la lysine par voie intragastrique.

3. ETUDE DE L'EFFET DES LIPIDES SUR L'ACTIVITE DUODENALE INSULINOTROPE

Les lipides possèdent un pouvoir calorique important; l'insuline, facteur clé de la gestion des ressources énergétiques, intervient dans leur métabolisme par son effet antilipolytique. Pourtant, donnés par voie orale, les acides gras ne font pas l'unanimité des chercheurs quant à leur effet sur la cellule B. C'est pourquoi nous avons vérifié l'action des lipides sur l'activité duodénale insulinotrope.

A. Expérience avec l'huile d'arachide

Nous avons utilisé une huile comestible courante, l'huile d'arachide du commerce, qui est riche en acides gras à longue chaîne (voir composition tableau 3 B). Cette huile a été administrée au rat sous forme d'émulsion aqueuse en solution à 20 g dans 100 ml à raison de 1 ml par 100 g de poids corporel.

Après 5 minutes de contact avec cette huile, la muqueuse duodénale a stimulé de façon moins prononcée le pancréas du rat receveur mais de façon toutefois non différente de la muqueuse de rat à jeun. L'injection d'extrait de mu-

queuse duodénale prélevé 15 minutes après l'administration d'huile d'arachide a provoqué chez le rat receveur, une libération d'insuline égale à celle que nous avions obtenue avec la muqueuse de rat à jeun. L'huile d'arachide, pendant les quinze minutes qui suivent son absorption, n'a statistiquement modifié en rien l'activité insulino-libératrice de la muqueuse duodénale. En revanche, l'injection de l'extrait huile 30 minutes non seulement n'a pas stimulé la production d'insuline mais l'a inhibée : l'insulinémie 1 minute après l'injection de cet extrait (80 $\pm$ 17 μU / ml) était plus basse ($p < 0,01$) que celle mesurée après l'injection de l'extrait "muqueuse à jeun". Une observation identique a été faite avec les extraits de muqueuse prélevés 45 et 60 minutes après l'administration intragastrique d'huile. La Fig. 20 nous montre la double inhibition de la libération d'insuline mise en évidence avec des extraits de muqueuses duodénales prélevées à différents temps après l'administration intragastrique d'huile d'arachide à des rats donneurs.

* * *

Crespin et coll. (1973) rapportent qu'une élévation du taux sanguin des acides gras de 600 - 800 mEq / l produit une élévation significative de l'insulinémie. Par contre, d'autres auteurs (Carrol et Nestel 1972, Coran et coll. 1972..)

n'observent aucune variation de l'insulinémie suite à l'augmentation importante du taux des acides gras qu'ils provoquent. Il nous a semblé important de vérifier d'une part le contenu en acides gras libres des extraits de muqueuse duodénale que nous avons injectés et d'autre part, l'action de ces quantités d'acides gras sur le pancréas. Le tableau 9 présen-

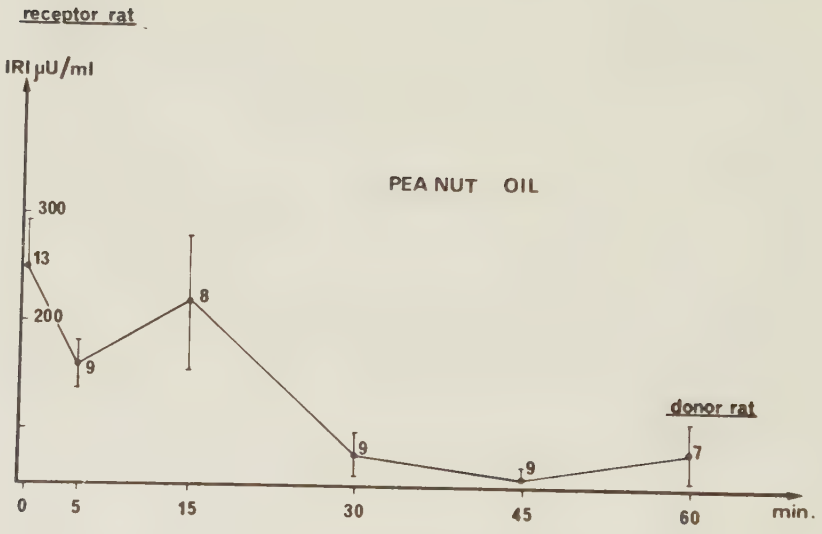


Fig. 20 : Variations de l'activité duodénale insulinotrope du rat après l'administration intragastrique d'huile d'arachide.

te les variations en acides gras libres contenus dans les extraits .

Tableau 9 . Variation de la quantité des acides gras libres contenus dans les extraits de muqueuse duodénale provenant de rats sacrifiés après différents intervalles de temps après l'administration intragastrique d'huile d'arachide.

Temps (minute) :	*0*	*5*	*15*	*30*	*45*	*60*
AGL (mEq / l) :	*0,47*	*0,40*	*0,43*	*0,50*	*0,59*	*1,22*

Il est intéressant de noter que les extraits qui ont stimulé le moins la libération d'insuline (extraits 30,45 et 60 min.) sont paradoxalement ceux qui contiennent le plus d'AGL. L'extrait 15 minutes et l'extrait 30 minutes contiennent une quantité approchante d'AGL (0,43 et 0,50) mais ont stimulé de façon différente ($p < 0,005$) la libération d'insuline.

B. Expérience avec le palmitate

L'huile d'arachide testée contient plus de 40 % de palmitate lié par liaison ester à du glycérol. Pour connaître lequel de ces deux composés (palmitate ou glycérol) possédait

l'action mise en évidence avec cette huile, nous avons administré,dans l'estomac de rats donneurs, de l'acide palmitique sous forme de sel de potassium, à raison de 0,8 g / kg de poids corporel. La muqueuse duodénale de ces rats, sacrifiés à différents intervalles de temps n'a jamais stimulé chez le rat receveur la riposte d'insuline de façon différente

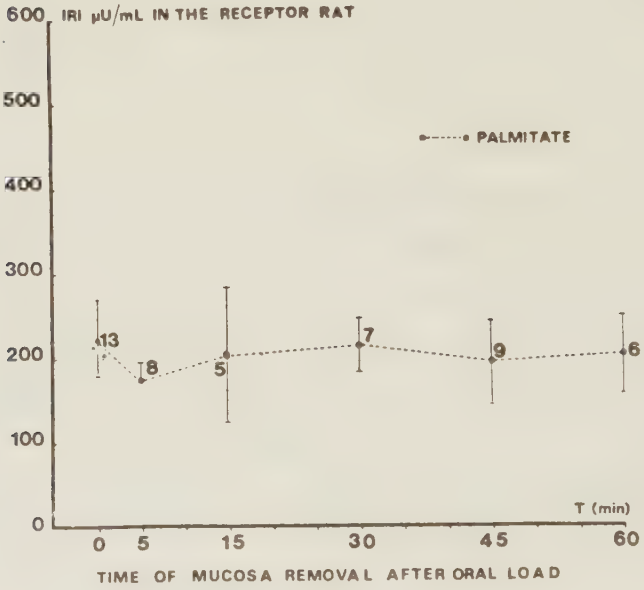


Fig. 21 : Variations de l'activité duodénale insulinotrope de rats recevant du palmitate par voie intragastrique.

de celle produite par l'extrait de muqueuse duodénale du rat à jeun (Fig. 21). Il ne semble donc pas que le palmitate soit responsable de l'inhibition de la sécrétion d'insuline observée au niveau de la muqueuse duodénale après l'administration d'huile d'arachide.

Après l'administration de palmitate, le contenu des extraits de muqueuse duodénale en acides gras libres ne varie que très peu. La quantité maximum a été mesurée dans l'extrait 5 minutes, la quantité minimum dans l'extrait 60 minutes (Tableau 10).

Tableau 10 . Variation de la quantité d'acides gras libres contenus dans les extraits de muqueuse duodénale provenant de rats sacrifiés à différents intervalles de temps après l'administration de palmitate dans l'estomac.

Temps (minutes) :	*0*	*5*	*15*	*30*	*45*	*60*
AGL (mEq / L) :	*0,47*	*0,48*	*0,42*	*0,42*	*0,41*	*0,40*

C. Expérience avec le glycérol

A la différence du palmitate, le glycérol administré par voie intragastrique chez le rat a fait varier l'activité duodénale insulinotrope de façon analogue à l'huile d'arachide, avec double pic négatif (Fig. 22).

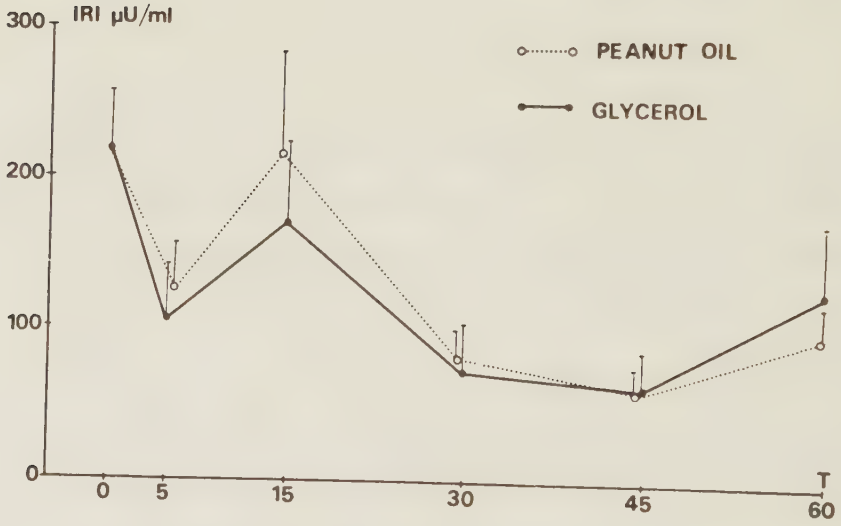


Fig. 22 : Comparaison de l'activité duodénale insulinotrope de rats recevant par voie intragastrique de l'huile d'arachide ou du glycérol.

4. APPROCHE DU MECANISME D'ACTION

L'utilisation de produit intervenant dans le métabolisme d'un composé alimentaire permet une étude des mécanismes de sécrétion que ce composé alimentaire suscite. Divers intermédiaires de la glycolyse, divers produits inhibant ou stimulant le métabolisme du glucose ont été employés dans plusieurs études pour découvrir le site d'action de ce sucre sur la sécrétion de l'insuline. La streptozotocine, la puromycine, l'actinomycine, l'oligomycine, sont des substances antibiotiques qui interfèrent dans les réactions de synthèse des protéines ; ces produits ont été également largement utilisés dans l'approche de la compréhension du mécanisme de la sécrétion de la cellule B.

Le système rat donneur / rat receveur permet de dissocier l'action des aliments dans la stimulation de la libération de l'insuline ; nous avons utilisé de tels composés, inhibiteurs ou intermédiaires du métabolisme du glucose, dans l'étude de l'action de ce sucre sur l'activité insulino-libératrice de la muqueuse duodénale.

A. Expérience avec le 2-désoxy-D-glucose

Le 2 désoxy-D-glucose (2DG) est un inhibiteur de la phosphoglucose-isomérase et de la 6 phospho-déhydrogénase (Wick et coll. 1957, Machinski et Ellerman 1968). En bloquant le catabolisme du glucose il inhibe la sécrétion d'insuline produite par ce sucre (Renold 1970).

L'administration intragastrique de 2DG chez le rat n'a pas modifié 5 minutes plus tard, l'activité insulino-libératrice du duodénum, au contraire de ce que nous avions observé avec le glucose. A ce moment-là (5 minutes) nous avons observé une disparition du premier pic de l'activité insulinotrope (Fig. 23). Les extraits de muqueuse duodénale prélevés 15, 30, 45 ou 60 minutes après le 2DG ont, quant à eux, conservé un DIRA similaire à celui mesuré dans les extraits de muqueuse duodénale après le glucose.

B. Expérience avec l'actinomycine D

L'actinomycine, premier agent antibiotique isolé de l'espèce streptomyces, se divise en plusieurs groupes : A, C, D... L'actinomycine D constitue la substance la plus stable et la moins toxique. Le mode d'action de cet antibiotique est lié à la transcription du DNA : il se fixe sur le DNA

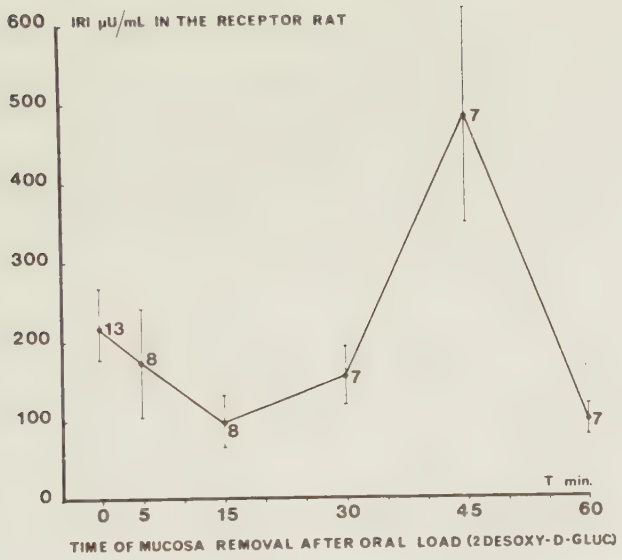


Fig. 23 : Variations de l'activité duodénale insulinotrope de rats recevant du 2-désoxy-D-glucose par voie intragastrique.

et rend impossible l'action de la RNA polymérase.

Nous avons injecté 30µg d'actinomycine D par 100 g de poids corporel, chaque heure, par voie intrapéritonéale, la première injection ayant été faite 3 heures avant l'administration intragastrique de glucose ou d'arginine (Modifié d'après Stiffel et coll. 1971). Après la troisième injection

la muqueuse duodénale de ces animaux présente une activité insulinotrope similaire à celle des rats à jeun non traités.

Les rats donneurs traités à l'actinomycine D puis recevant du glucose (Fig. 24) ont présenté une activité duodénale insulinotrope semblable à celle obtenue avec des rats non traités recevant la même dose, à tous les temps sauf au temps 5 minutes. Le pic de DIRA n'apparaît pas à cinq mi-

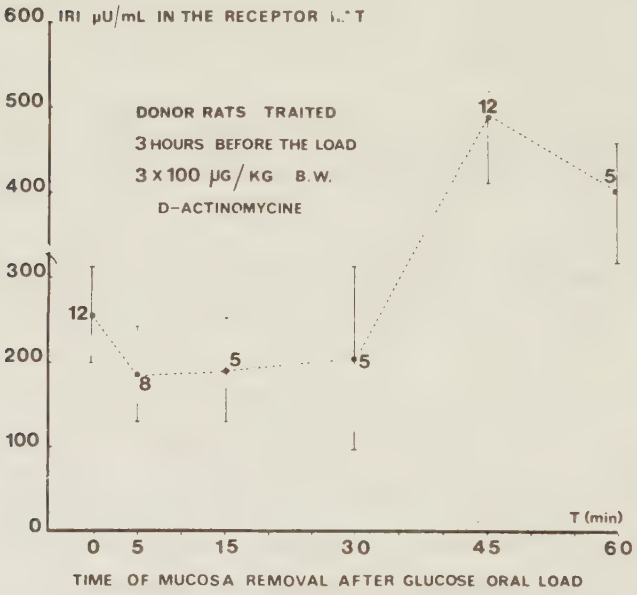


Fig. 24 : Variations de l'activité duodénale insulinotrope de rats traités à l'actinomycine D et recevant du glucose par voie intragastrique.

nutes chez les rats qui ont été traités à l'actinomycine D.

Nous avons ensuite administré de l'arginine à des rats donneurs traités à l'actinomycine D. La muqueuse duodénale de ces animaux ne possédait plus aucune activité insulinotrope dès 5 minutes après l'administration intragastrique d'arginine (Fig. 25).

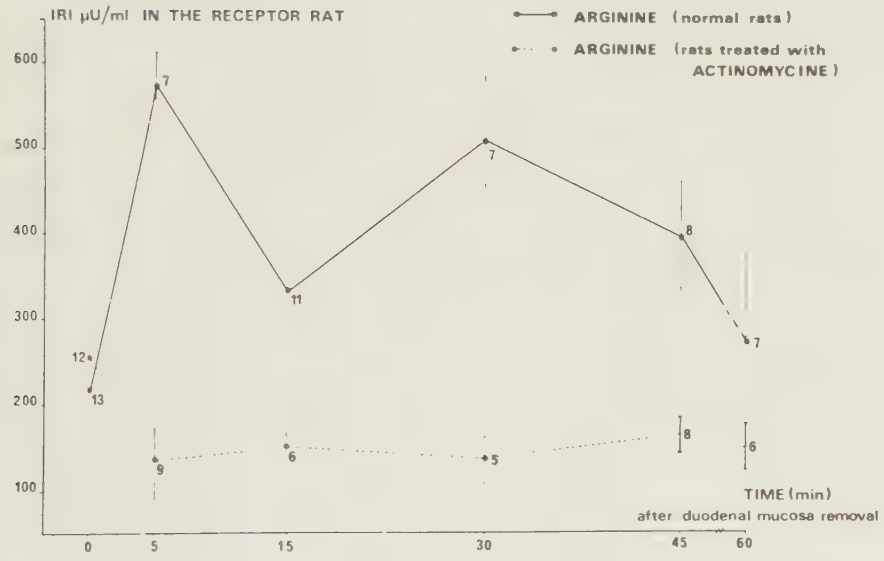


Fig. 25 : Comparaison de l'activité duodénale insulinotrope de deux séries de rats recevant de l'arginine dans l'estomac, mais dont l'une a été traitée à l'actinomycine D.

Cette inhibition de l'activité insulinotrope est significative pour les temps 5 minutes ($p < 0,001$) 30 minutes ($p < 0,005$) et 45 minutes ($p < 0,01$) lorsqu'on compare ces valeurs à celles obtenues aux mêmes temps avec des extraits de muqueuse duodénale de rats non traités recevant de l'arginine.

* * *

5. ESSAI DE PURIFICATION

On peut classer grossièrement les hormones intestinales en deux groupes selon leur structure moléculaire : le groupe de la gastrine,comprenant la gastrine et la cholécystokinine-pancréozymine et le groupe de la sécrétine,comprenant la sécrétine,l'entéroglucagon,le GIP et le VIP (Rehfeld et coll.1975).Ces deux groupes d'hormones sont de petits peptides dont le PM est compris entre 2200 et5105.Si le DIRA est un facteur hormonal, il pourrait appartenir à l'une de ces deux familles. Son poids moléculaire serait compris entre 2000 et 6000 environ. C'est la raison pour laquelle nous avons adopté et modifié une méthode de purification pour petits peptides (voir description dans le chapitre Matériel et Méthodes).

Nous avons essayé la technique de Ratcliffe avec un extrait de muqueuse duodénale provenant de rats sacrifiés 5 minutes après l'administration de glucose. Cet extrait non purifié possédait une activité insulinotrope importante (473 ± 67 µU / ml).

Nous avons utilisé de la poudre Vicor à raison de 90,8 mg par ml d'extrait. Les fractions 1, 2 et 3 prélevées au cours de l'extraction ont montré une activité insulinotrope faible (Fig. 26). Par contre, la fraction 4, correspondant

à l'élution par un mélange acétone-eau , s'est montrée plus insulinotrope puisque son injection chez le rat receveur a libéré 1 minute plus tard 396 ± 76 µU / ml d'insuline. Cette activité insulinotrope est néanmoins plus faible que celle obtenue avec l'extrait non purifié.

En augmentant la quantité de poudre de verre

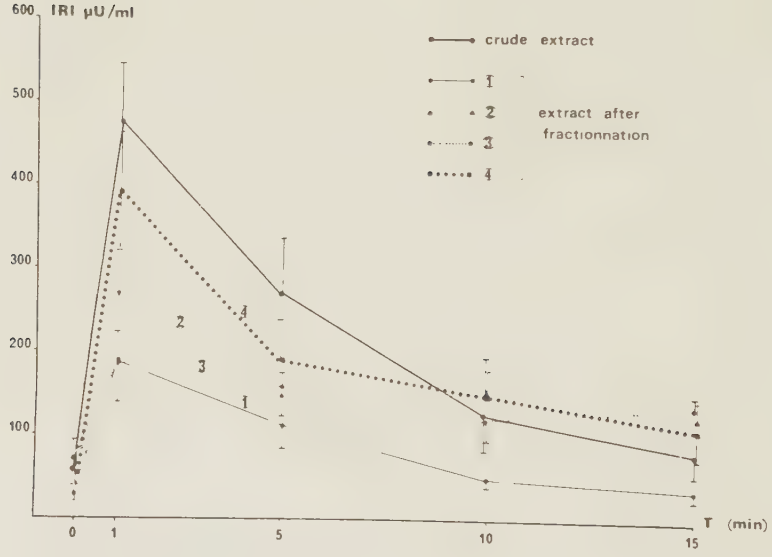


Fig. 26 : Comparaison de l'activité duodénale insulinotrope de diverses fractions d'un extrait de muqueuse duodénale après l'administration orale de glucose.

(111 mg / ml, 133 mg / ml puis 200 mg / ml) nous avons amélioré sensiblement la purification puisque l'extrait glucose 5 minutes traité avec cette dernière quantité (200 mg / ml) possède dans sa fraction 4 une activité B qui, à quantité et concentration égales élève l'insulinémie du rat receveur de façon plus importante que ne le faisait le même extrait non purifié (Tableau 11).

Tableau 11 . Variations, en fonction de la température (100° C pendant 5 minutes) , de l'activité duodénale insulinotrope d'un extrait de muqueuse duodénale prélevé chez le rat 2 minutes après l'administration intragastrique de glucose.

Temps (minutes)	*0*	*1*	*5*	*10*
Avant chauffage (IRI µU / ml)	*57*	*315*	*167*	*184*
Ecart type sur la moyenne (5 rats)	*5*	*117*	*59*	*23*
Après chauffage (IRI µU / ml)	*32*	*138*	*154*	*84*
Ecart type sur la moyenne (6 rats)	*4*	*39*	*27*	*15*

Nous avons ensuite testé la sensibilité de l'activité duodénale insulinotrope à la chaleur en soumettant pendant 5 minutes à 100° C un extrait de muqueuses duodénales prélevées 5 minutes après une surcharge intragastrique de glucose. Après ce traitement l'extrait n'a libéré que 138 ±

39 µU / ml d'insuline 1 minute après son injection chez le rat receveur, alors que cet extrait stimulait, avant son passage à 100° C, la libération de 478 ± 67 µU / ml d'insuline (Tableau 11).Le DIRA est donc thermosensible.

* * *

6. ETUDE DE L'ACTION D'UNE SULFONYLUREE SUR L'ACTIVITE DUODENALE INSULINOTROPE (DIRA)

Il y a plus de trente ans que Janbon et coll. (1942) ont découvert les propriétés hypoglycémiantes des sulfonamidés et près de vingt ans que plusieurs de ces produits sont utilisés couramment en thérapeutique. Dès 1944, Loubatières publie les résultats d'une série de travaux sur les effets physiologiques et pharmacologiques de ces substances qui possèdent "un mode d'action fondamental identique : la stimulation de la sécrétion d'insuline ". En dépit des nombreuses études faites avec les sulfonylurées, on ignore pour l'instant le mécanisme d'action de ces produits. Plusieurs auteurs ont fourni des résultats qui permettent de penser que l'effet des sulfonylurées ne se borne pas à une action sur la cellule B. En 1969, Heptner et coll. proposent l'intervention d'une hormone gastro-intestinale dans l'action du glibenclamide, sulfonylurée de deuxième génération qui possède une action hypoglycémiante très prononcée. Cette hypothèse a, depuis lors, été renforcée par plusieurs observations. Kellner et coll. (1969) ont montré que du glibenclamide marqué au C^{14} administré au rat par voie intragastrique ne se concentrait pas dans le pancréas mais qu'au contraire

la teneur en glibenclamide du pancréas n'était que le 1/5 - 1/10 de la concentration sérique (g de pancréas / ml de sérum). D'autre part, Hellman et coll. (1969) ont montré lors d'expériences d'auto-radiographie, l'affinité élevée de la muqueuse intestinale et non du tissu pancréatique pour le glibenclamide. Fabre (1974) observe que le maximum de la réponse insulinique au glibenclamide précède le moment où la concentration plasmatique de ce produit est maximale. Nous avons étudié l'action du glibenclamide sur l'activité duodénale insulinotrope. Cette étude a commencé chez le rat.

A. Expérience chez le rat

Une série de rats donneurs a reçu, par sonde intragastrique, 0,02 mg de glibenclamide par 100 g de poids corporel. Cette quantité correspond à celle qu'ont proposé Bänder et coll. (1969) pour abaisser significativement la glycémie.

Les rats ont été sacrifiés 1/2, 1, 3, 5, 10, 25, 30, 35, 45 et 90 minutes après la prise de glibenclamide. Leurs muqueuses duodénales prélevées à ces différents intervalles de temps, ont été injectées sous forme d'extrait aqueux, chez le rat receveur. L'extrait de muqueuse 1/2 minute stimule fortement la libération d'insuline puisque le taux portal d'IRI passe de 116 (muqueuse 0) à 384 µU / ml IRI (muqueuse

1/2 minute). Cette différence est mathématiquement significative ($p < 0,025$). Les rats sacrifiés 1 minute ou 3 minutes après le glibenclamide n'ont plus montré dans leur muqueuse une activité insulinotrope différente de celle de la muqueuse à jeun (0). En revanche, nous retrouvons une telle activité insulinotrope dans les extraits de muqueuse duodénale de rats tués 25, 30 et 35 minutes après le glibenclamide (Fig. 27).

En ne reportant sur le graphique que les valeurs d'insuline du rat receveur 1 minute après l'injection de l'extrait nous avons une image plus lisible de l'activité insulinotrope contenue dans la muqueuse duodénale du rat donneur. Nous observons mieux la stimulation biphasique du DIRA après le glibenclamide (Fig. 27 ligne pointillée). Le premier pic se manifeste 30 sec. après l'administartion; il est rapide et bref puique 30 sec. plus tard (1 min. après le glibenclamide)la valeur obtenue est voisine de la valeur 0. Le second pic est plus étalé et d'amplitude légèrement plus faible : il commence 25 minutes après la prise orale et redescend à 45 minutes, mais il n'atteint "que" 286 µU / ml d'IRI. Il est pourtant significatif mathématiquement ($p < 0,05$). Puisque cette figure nous donne l'image des variations de l'activité insulinotrope de la muqueuse duodénale, il est intéressant de suivre aussi les variations de l'in-

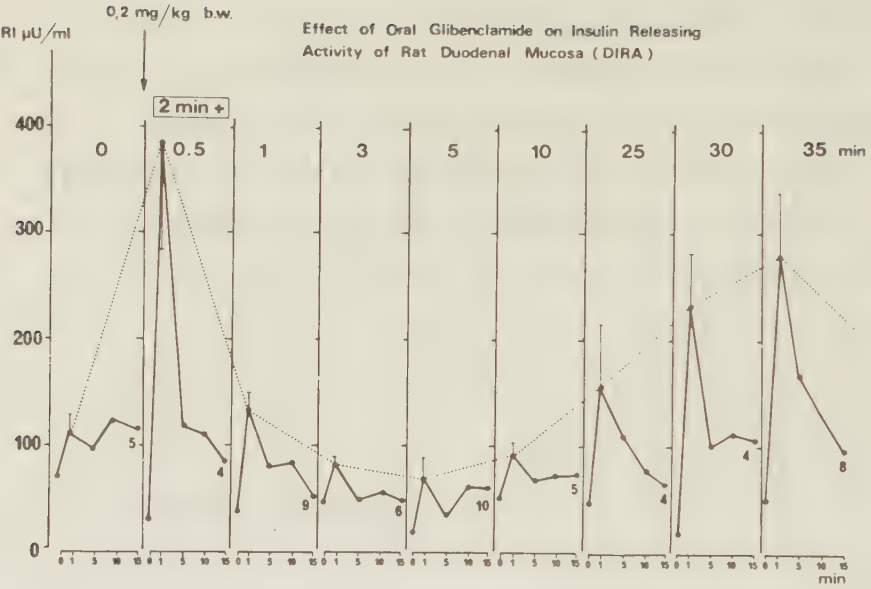


Fig. 27 : Variations de l'activité duodénale insulinotrope de rats recevant du glibenclamide dans l'estomac.

sulinémie de ces mêmes rats donneurs. Nous observons (Fig.28) une élévation marquée de l'insulinémie 3 minutes après l'administration de glibenclamide à un moment où le DIRA est déjà revenu à sa valeur de départ. Cette élévation de l'insulinémie se répète à 35 minutes en suivant l'élévation du DIRA dans

la muqueuse duodénale.

Nous avons fait doser (par la maison Hoechst) le contenu en glibenclamide des extraits de muqueuse duodénale après l'administration intragastrique de ce produit. La concentration maximale de glibenclamide mesurée dans ces extraits s'élevait à 180 ng / ml. Nous avons alors injecté

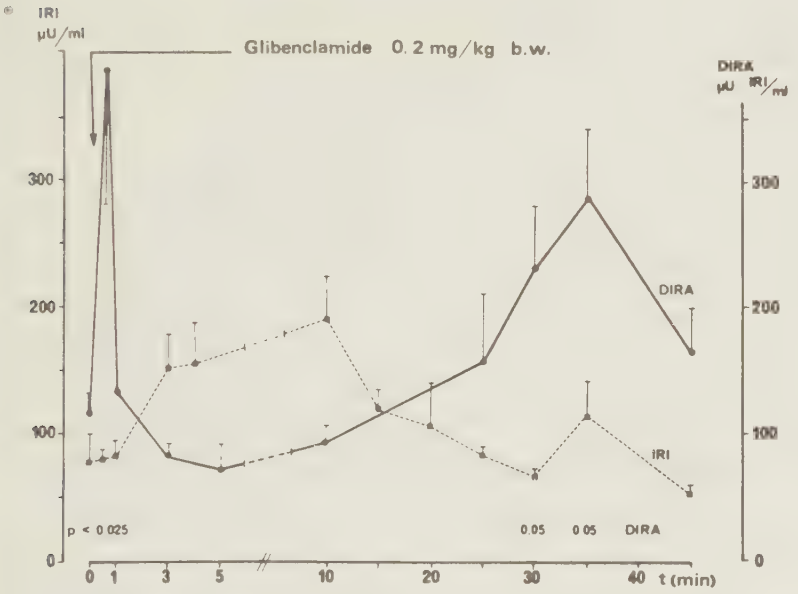


Fig. 28 : Variations de l'insulinémie périphérique et du DIRA dans la muqueuse duodénale de rats recevant par voie intragastrique du glibenclamide.

chez le rat receveur, à titre de contrôle, une quantité de glibenclamide (200 mg) à concentration 5 fois plus élevée (1 ug / ml) dissoute dans du plasma. Cette injection n'a pas provoqué une libération d'insuline différente de celle qui a suivi l'injection de plasma seul (Fig. 29).

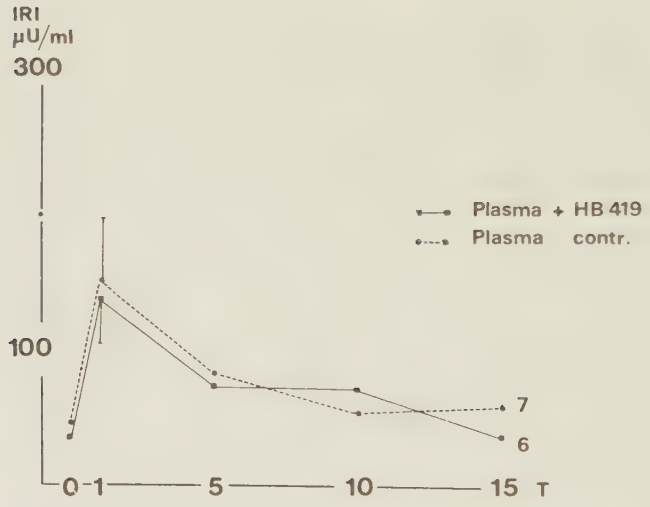


Fig. 29 : Variations de l'insulinémie du rat après l'injection de plasma d'autres rats seul ou additionné de glibenclamide (200 ng).

B. Expérience chez l'homme

Nous avons ensuite entrepris une série d'expériences avec le glibenclamide chez l'homme, utilisé comme sujet donneur de muqueuse. La prise de fragments duodénaux humains s'est faite à l'aide d'une sonde à aspiration-section du type Charles Debray. La quantité de glibenclamide administrée était de 5 mg dissous dans 50 ml d'eau. Cette dose correspond à une tablette du produit ; elle provoque une hypoglycémie significative 60 minutes après son absorption.

Chez le premier volontaire nous avons prélevé des fragments de muqueuse avant, puis toutes les 5 minutes après l'administration du produit. Chez ce sujet, l'insulinémie et la glycémie ne varient pas pendant les trente premières minutes, alors que la muqueuse a présenté une activité insulinotrope très différente. La valeur de base du DIRA a chuté après 5 min. puis s'est élevée de façon significative à 10,15,20 et 25 min. pour retrouver à 30 minutes une valeur leur comparable à celle du départ. C'est à partir de 30 minutes que l'insulinémie de ce sujet a commencé à s'élever, alors que la glycémie baissait. A 70 minutes l'insulinémie est toujours très élevée et la glycémie très basse. Si l'on suit les variations sanguines de glibenclamide on observe une augmentation croissante de sa concentration qui peut

être assimilée à une droite. Au temps 30 minutes le taux de glibenclamide est inférieur à 100 ng / 1 ml ; dès 30 minutes la croissance des taux de glibenclamide et d'insuline s'est faite de façon presque parallèle (Fig. 30).

Cette expérience a été répétée chez 6 volontaires

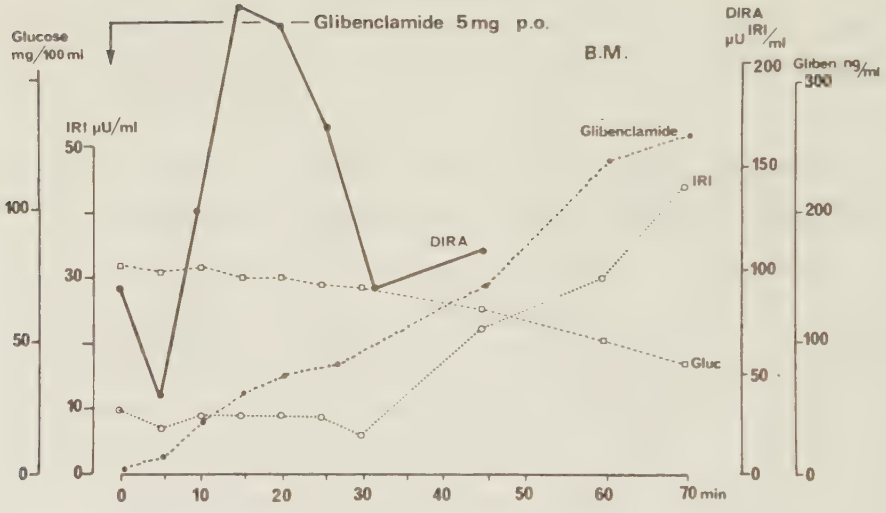


Fig. 30 : Variations chez 1 sujet qui reçoit 5 mg de glibenclamide per os, au niveau périphérique, de l'insulinémie, de la glycémie et des taux de glibenclamide, et du DIRA dans la muqueuse duodénale.

sains. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative du DIRA 15 minutes après l'absorption de glibenclamide, moment où ni l'insulinémie ni la glycémie n'ont encore varié (Fig. 31).

L'extrait de muqueuse duodénale glibenclamide 60

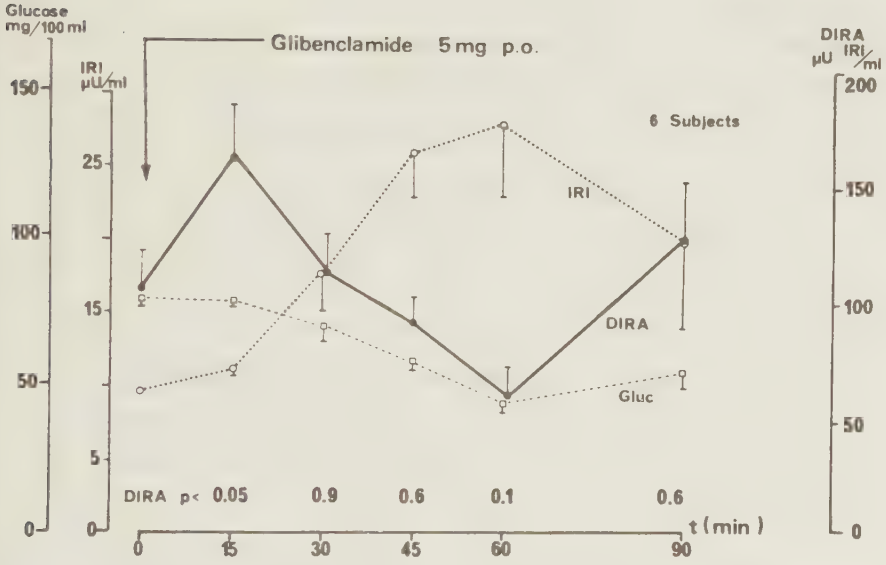


Fig. 31 : Variations chez 6 sujets qui reçoivent 5 mg de glibenclamide per os, dans le sang périphérique, de l'insulinémie et de la glycémie et du DIRA dans la muqueuse duodénale.

minutes produit une libération d'insuline inférieure à celle qui suit l'injection de l'extrait O ; cette déplétion est suivie d'un regain d'activité que l'on mesure en injectant l'extrait de muqueuse glibenclamide 90 minutes.

Pour vérifier la rapidité de réaction de la muqueuse duodénale au glibenclamide, nous avons effectué une duodénoscopie chez un volontaire. Le duodénoscope permet, en même temps que le contrôle visuel de sa position, l'injection du produit au niveau duodénal et le prélèvement de fragments de muqueuse de façon presque simultanée.

Nous avons injecté par le duodénoscope 50 ml de solution de glibenclamide dans le duodénum (d 2) et prélevé des fragments de muqueuse 2 minutes 45 après la fin de l'injection. Ce bref intervalle de temps a suffi à la muqueuse pour tripler son activité insulinotrope (Fig. 32) Cette activité duodénale insulinotrope retrouve sa valeur de départ alors que les taux sanguins de glibenclamide n'ont pas encore varié significativement, et que l'insulinémie a déjà amorçé son ascension.

Nous avons répété ces expériences de biopsies duodénales par sonde en remplaçant la solution de glibenclamide par un même volume d'eau à pH identique,pour vérifier si cette augmentation est bien due au glibenclamide et n'est pas la conséquence de l'acidification duodénale provoquée par le pas-

sage de la solution dans l'intestin. Aucune variation de l'activité insulinotrope n'a été mesurée jusqu'à 60 minutes après l'ingestion de l'eau ; à ce temps nous avons mesuré une très légère augmentation (12 %) du DIRA, statistiquement non significative.

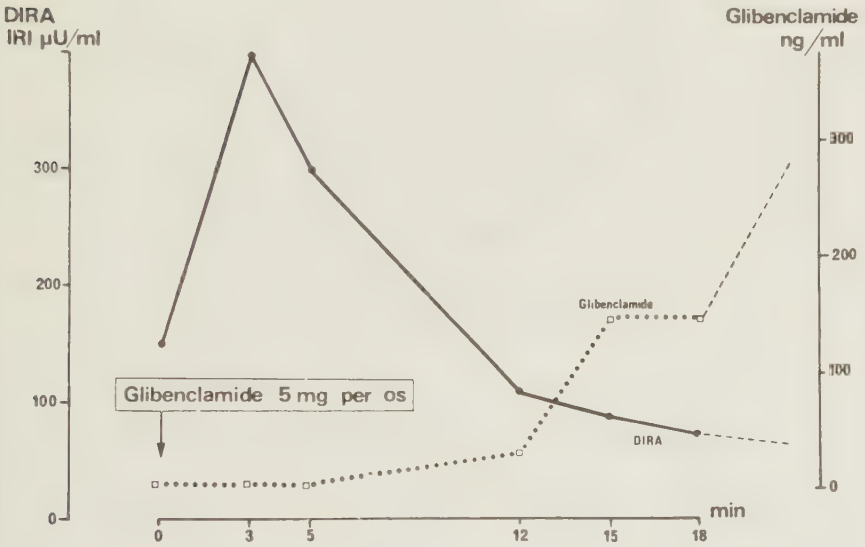


Fig. 32 : Variations du DIRA dans la muqueuse duodénale et des taux de glibenclamide dans le sang d'un sujet recevant 5 mg de glibenclamide dans le duodénum.

7. RECHERCHE DU DIRA DANS LA CIRCULATION SANGUINE

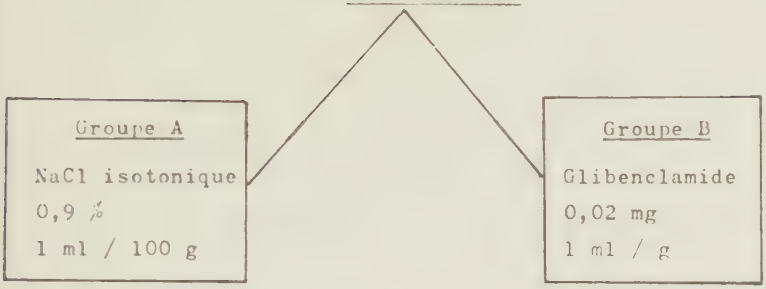
Le DIRA est localisé dans la muqueuse duodénale, mais possède une activité sur la cellule B. Nous avons tenté, dans les expériences suivantes, de mettre en évidence le DIRA entre son lieu de production et son lieu d'action : dans le sang circulant.

Une solution de glibenclamide (0,02 mg / ml pour 100 g de poids corporel) a été administré à un groupe de rats à jeun (groupe B). Un groupe de rats témoins (groupe A) a reçu une même quantité de solution saline physiologique. Le plasma des rats ayant reçu le glibenclamide ou la solution saline a été injecté à raison de 0,2 ml chez le rat receveur. De plus, une quantité de 200 ng de glibenclamide a été ajoutée au plasma de rat ayant reçu par voie orale le glibenclamide ou la solution saline (Tableau 12). L'injection de plasma de rats surchargés en solution saline et sacrifiés 15 minutes plus tard n'a libéré qu'une modeste quantité d'insuline chez le rat receveur. En ajoutant à ce plasma 200 ng de glibenclamide, la libération d'insuline n'est pas modifiée. L'injection chez le rat receveur de plasma de rats ayant reçu du glibenclamide et sacrifiés 15 minutes plus tard n'a pas libéré une quantité d'insuline différente

Tableau 12 Administration orale

chez 2 groupes

de rats donneurs



Après 15 minutes, le sang de ces animaux est prélevé sur anticoagulant

↓

Injection chez les rats receveurs des plasmas des rats donneurs

↓

Libération d'IRI 1 minute plus tard

	Groupe A	Groupe A + Glib. (200 ng)	Groupe B	Groupe B + Glib. (200 ng)
X	187	144	163	697
SEM	24	26	21	170
n	5	7	5	6

de celle libérée par l'injection de plasma contrôle. En revanche, en ajoutant 200 ng de glibenclamide au plasma des rats ayant reçu du glibenclamide nous avons obtenu une libération d'insuline nettement augmentée ($p < 0,05$). Cette libération d'insuline est plus du triple de celle obtenue avec le même plasma avant l'addition de glibenclamide (Fig.33).

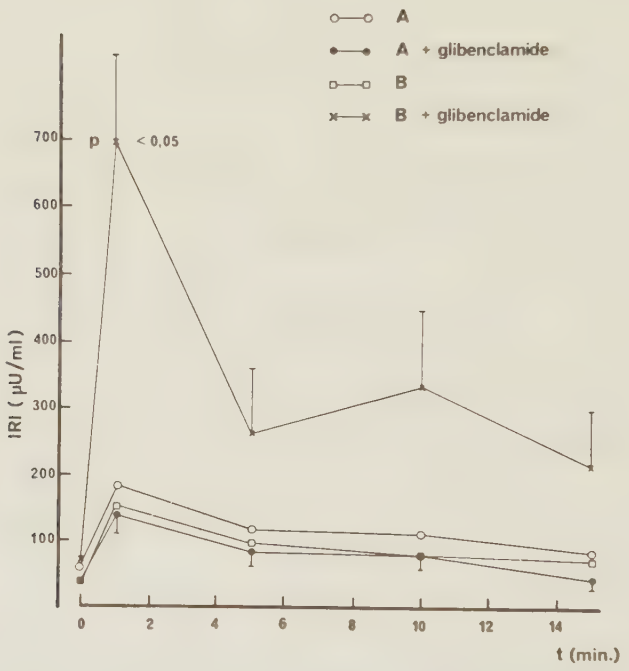


Fig. 33 : Variations de la réponse en insuline du rat receveur lors de l'injection de différents plasma additionnés ou non de glibenclamide.

V - DISCUSSION

1. L'AXE ENTERO - PANCREATIQUE

Plus de 46 articles ont été publiés entre 1923 et 1936 et traitent de l'activité hypoglycémiante d'extraits de muqueuse intestinale. Loew,Gray et Ivy (1940) ont répertorié ces publications et les considèrent comme dépourvues de preuves indiscutables et souvent comme contradictoires. Ces auteurs concluent au manque de preuves de l'existence d'un contrôle exercé par le tube digestif sur la fonction pancréatique ; ils vont ainsi condamner pour plusieurs années toute recherche dans cette direction. Pourtant cette idée de contrôle entéro-pancréatique a ressurgi à chaque fois qu'une hormone intestinale fut découverte ou qu'une méthode de dosage de ces hormones intestinales fut mise au point. Jusqu'à ce jour, aucune hormone gastro-intestinale connue ne possède toutes les propriétés requises pour jouer le rôle attribué au médiateur intestinal.

Un axe entéro-pancréatique existe-t-il vraiment ? Si tel est le cas, sa fonction serait d'augmenter ou du moins d'accélérer la réponse du pancréas à la suite de l'ingestion

d'aliments, de telle sorte que les sécrétions pancréatiques qui s'ensuivraient, seraient plus importantes ou du moins plus rapides que celles qui suivent normalement l'élévation de la concentration sanguine de ces aliments.

Nous avons vu, aussi bien avec le glucose (Fig.14) qu'avec l'arginine (Fig. 18) que d'une part ces aliments provoquent l'apparition immédiate (quelques minutes) d'un facteur insulinotrope dans la muqueuse duodénale et que, d'autre part, les taux sanguins de ces aliments ne sauraient, à eux seuls, expliquer la libération d'insuline qui apparaît alors.Après l'administration intragastrique de 2 g ou de 4 g de glucose, nous avons mesuré chez le rat receveur des glycémies identiques après l'administration de 2 ou de 4 g de glucose,alors que l'insulinémie variait du simple au double. Cette différence des taux d'insuline dans ces deux groupes de rats, provient donc de facteur(s) autre(s) que la glycémie puisque celle-ci ne varie pas d'un groupe à l'autre.

Plusieurs auteurs sont arrivés à des conclusions similaires en observant qu'à la suite d'une surcharge orale de glucose, le pic de l'insulinémie se manifeste avant celui de la glycémie (Reyes-Leal et coll. 1973; Cataland et coll. 1974; Strubbe et Bouman 1975). Cette libération d'insuline ne peut avoir pour origine l'action du glucose sur la cellule B puisqu'au moment où elle se produit (2 - 3 minutes après

le glucose) la glycémie n'a varié que peu. Le pancréas a donc réagi à un autre stimulus que l'élévation de la glycémie : l'effet ne peut précéder la cause.

Quelle peut être la nature de ce stimulus de la sécrétion d'insuline ? Elle ne peut pas être d'origine nerveuse. En effet, l'administration intragastrique d'un volume identique d'une solution physiologique (p.40) n'a modifié ni la glycémie ni l'insulinémie. D'autre part, Grenier et coll. (1969) ont montré, dans une préparation de chien in vivo, où ne subsiste entre intestin et pancréas qu'une liaison sanguine, que la voie nerveuse ne peut pas être concernée dans la stimulation d'insuline qu'ils observent.

On peut proposer, comme l'ont fait indépendamment en 1964, Goetz et coll. et Balsano, qu'il existe bien un transmetteur pancréatique de nature humorale mais que celui-ci serait localisé au niveau portal ou hépatique. McIntyre, en 1965, a montré chez deux patients à qui l'on a pratiqué une dérivation veine porte - veine cave, supprimant ainsi l'action hépatique, que le passage du glucose par le foie n'est pas essentiel à la différence de stimulation obtenue avec le glucose per os. Si donc l'hypothèse d'un système hépatique stimulant la sécrétion d'insuline peut être écartée, on peut encore envisager la localisation d'un tel système au niveau portal. Or, nos expériences avec deux séries

distinctes de rats, l'une réagissant à la nourriture, l'autre servant à mesurer ces réactions, a permis de localiser un mécanisme de stimulation du pancréas dans le duodénum et partiellement dans le jéjunum, alors que l'iléon ou le gros intestin sont dépourvus d'une telle activité insulinotrope (Tableau 5 B - Hadjikahni et coll. 1970).

Le système que nous avons employé permet, de plus, en écartant l'action directe de la nourriture et de ses métabolites sur le pancréas, de ne pas tenir compte de diverses influences (nerveuses, hormonales...) et d'isoler les phases de la digestion, ce qui est impossible si l'on entreprend une étude chez un seul animal.

* * *

2. MODULATION PAR DIVERS COMPOSES ALIMENTAIRES DE FACTEUR(S) DUODENAUX AGISSANT SUR LA SECRETION DE L'INSULINE

A. Contenu des extraits en aliments

Nous avons présenté dans le chapitre IV les variations de l'activité insulinotrope d'extraits de muqueuse duodénale de rats donneurs,après l'administration de divers aliments par sonde intragastrique. Le premier contrôle que nous avons effectué portait sur le contenu en aliments de ces extraits afin d'écarter la possibilité d'une action directe de ceux - ci sur la cellule B .

En dosant le glucose dans les extraits duodénaux après l'administration intragastrique de ce sucre, nous avons constaté (Tableau 6) que l'extrait glucose 15 minutes en contenait le plus (88 mg / 100 ml) alors que cet extrait était l'un des moins insulinotropes. Les extraits glucose 30 minutes et glucose 45 minutes contenaient une quantité de glucose pratiquement identique, alors qu'ils possédaient une activité insulinotrope différente ($p < 0,005$). De plus, l'injection de 0,2 ml de solution contenant 88 mg / 100 ml de glucose dans le tronc coeliaque du rat receveur - correspondant à la quantité maximum de glucose mesurée dans les ex-

traits - n'a pas modifié de façon sensible l'insulinémie de ces animaux. Ce taux n'est d'ailleurs pas plus élevé que celui de la glycémie normale du rat.

De la même manière, pour écarter l'éventualité d'une action directe de l'arginine sur la cellule B nous avons mesuré le contenu en arginine des différents extraits après l'administration per os de cet acide aminé (tableau 7). L'extrait arginine 30 minutes contenait une quantité d'arginine presque identique à celle de l'extrait de muqueuse de rats à jeun. Ces deux extraits ont stimulé de façon différente la libération d'insuline. D'autre part, nous avons injecté chez le rat receveur, de l'arginine en même quantité que celle que nous avons mesuré dans les extraits arginine 5 min. (33 mg). Aucune libération d'insuline significative ne s'en est suivie (tableau 8). Enfin, les quantités d'arginine utilisées couramment pour obtenir une sécrétion d'insuline ont été signalées comme 5 fois plus importantes que la quantité maximum de cet acide aminé, mesurée dans les extraits (Effendic et coll. 1971; French et coll. 1971).

Crespin et coll., en 1973, montrent qu'une élévation de 0,6 - 0,8 mEq / l du taux des acides gras produit une élévation de l'insulinémie. Dans nos extraits duodénaux après l'administration d'huile d'arachide (tableau 9) nous avons observé une légère élévation du taux des acides gras

au temps 45 et 60 minutes. Paradoxalement, ce sont les extraits prélevés à ces temps qui se sont montrés les moins insulinotropes. L'extrait provenant de rats sacrifiés 30 minutes après une surcharge en huile d'arachide, qui possédait une activité insulinotrope inférieure à celle des extraits provenant de muqueuse de rats à jeun, contenait par contre une même quantité d'acides gras libres que ces dernières. Enfin, l'injection chez le rat receveur de 0,6 mEq / l d'acides gras libres (palmitate) - correspondant à la quantité mesurée dans l'extrait huile d'arachide 45 - n'a pas provoqué de changement significatif dans la libération d'insuline.

Lors de l'administration intragastrique de glibenclamide chez le rat, le taux maximum de cette sulfonylurée dans les extraits duodénaux était de 180 ng par ml . Une quantité 5 fois plus importante (1000 ng par ml) dissoute dans du plasma et injectée chez le rat receveur n'a pas libéré d'insuline de façon différente de celle provoquée par le plasma seul (Fig. 29).(p.88)

En conclusion, il ne semble exister aucune relation entre le contenu des extraits de muqueuse duodénale en aliments et l'activité insulinotrope que ces extraits manifestent sur la cellule B. La purification sur poudre de verre de l'extrait duodénal après glucose a montré de plus,

que cet extrait gardait toute son activité insulinotrope alors qu'il était débarassé de la plupart de ses contaminants dont le glucose. Enfin, il est difficile d'imaginer qu'un extrait intestinal qui possède une activité insulinotrope biphasique, dont les pics sont espacés de plusieurs minutes, la devrait à son contenu en aliments dont la concentration varie souvent de façon opposée.

* * *

B. Modulation du DIRA par les aliments

La stimulation de la libération d'insuline par le glucose agissant sur la cellule B est une évidence acceptée depuis longtemps (Anderson 1948). Il est relativement nouveau, par contre, de montrer que l'action insulinogénique de ce sucre ne se limite pas au pancréas mais qu'elle se manifeste aussi et peut-être en premier lieu au niveau duodénal ; nous avons montré que cette action se traduisait par l'apparition biphasique d'une activité insulinotrope (DIRA) proportionnelle à la charge alimentaire et spécifique du genre de nourriture absorbée.

A l'image de ce qui se passe dans la cellule B où l'insuline est sécrétée en deux phases, l'une immédiate et rapide, provenant d'un pool de réserve, l'autre décalée et prolongée, provenant d'une synthèse d'insuline "fraîche" (Curry et coll. 1968), on peut supposer que le duodénum possède un système analogue. Nous avons mis en évidence, dans la muqueuse duodénale du rat aussi bien après le glucose qu'après l'arginine ou le glibenclamide, donnés par voie intragastrique, une activité insulinotrope qui se comporte de manière similaire. Nous avons observé un premier pic de DIRA immédiat (1/2 à 5 minutes après le glibenclamide, le glucose ou l'arginine) et de courte durée ; après 1 minute

(glibenclamide) ou après 15 minutes (glucose et arginine) toute activité insulinotrope de la muqueuse duodénale a disparu, et même, après 30 minutes (glucose) elle est inférieure à celle mesurée dans la muqueuse à jeun. Quant au deuxième pic, il est décalé puisqu'il apparaît à 30 minutes pour l'arginine, à 35 minutes pour le glibenclamide ou à 45 minutes pour le glucose ; il est également plus soutenu puisque l'activité insulinotrope mesurée 90 minutes après le glucose donc 45 minutes après le deuxième pic, est encore plus importante que l'extrait glucose 15 minutes provenant de muqueuses prélevées 10 minutes après le premier pic. Les extraits de muqueuses duodénales de rats sacrifiés après l'administration de glibenclamide ou d'arginine présentent un deuxième pic de même apparence mais légèrement moins marqué (Fig. 19 et 21).

La lysine et le palmitate n'ont pas modifié de façon significative l'activité duodénale insulino-libératrice des rats donneurs.Ces deux produits,il est vrai,font rarement partie de la nourriture isolément, comme nous les avons administrés au rat. Le Nesmida (Fig. 17) a légérement stimulé le DIRA après 15 minutes.Cette stimulation pourrait en fait correspondre à un premier pic retardé et de moindre amplitude.Ce retard dans l'apparition de ce pic pourrait s'expliquer par le temps que nécessite l'hydrolyse des peptides du Nesmida en acides ami-

nés, seuls capables de traverser la membrane cellulaire pour stimuler le DIRA. Cette stimulation proviendrait partiellement de l'arginine contenue dans le Nesmida (Tableau 3A).

En revanche, après l'administration d'huile d'arachide ou de glycérol (Fig. 20 et 22), si nous avons également mesuré un double pic de DIRA, celui-ci est négatif. Un premier pic négatif apparaît 5 minutes après l'administration il est de faible amplitude et de courte durée. Un second pic négatif apparaît 30 minutes après la prise orale ; il est plus marqué et dure jusqu'à 60 minutes après l'huile ou le glycérol. L'injection des extraits de muqueuse duodénale 5, 30, 45 ou 60 minutes après le glycérol ou l'huile d'arachide a donc provoqué une inhibition de la libération d'insuline. On peut parler d'inhibition de la libération d'insuline et non de manque de stimulation pour plusieurs raisons. L'extrait duodénal est une solution à pression osmotique élevée dont la concentration protéique se situe aux environs de 5 g / 100 ml. Or l'injection d'une solution d'albumine à 4 g / 100 ml chez le rat receveur provoque une libération d'insuline qui s'élève à 120 µU / ml d'IRI, 1 minute après l'injection. (Fig. 11). Chez le rat receveur, l'injection de solution isotonique (NaCl physiologique) n'a provoqué aucune libération d'insuline et l'insulinémie de base (t = 0) n'a pas changé durant les 15 minutes qui sui-

vent l'injection (Fig. 11). La stimulation d'insuline produite par l'injection de muqueuse à jeun (219 ± 36 µU / ml IRI) résulte donc d'une part de l'action de cette solution concentrée (= blanc) et d'autre part de la présence dans l'extrait injecté d'un (ou de plusieurs) facteur(s) insulinotrope(s).

Or, en injectant les extraits de muqueuse duodénale prélevés 30 et 45 min. après l'administration d'huile d'arachide, nous avons mesuré des taux d'insuline qui étaient en dessous de cette valeur "blanc" . Ces extraits contenaient donc "quelque chose" qui a empêché le "blanc" d'agir sur la cellule B. Nous avons, d'autre part, obtenu avec les extraits duodénaux provenant de rats sacrifiés 30, 45 ou 60 minutes après l'administration d'huile d'arachide ou de glycérol, des valeurs basses d'insuline qui sont très homogènes. (voir écart type de la moyenne, Fig. 20 et 22). Lors de l'injection d'extraits de muqueuse de rats à jeun, ou d'une solution contrôle (albumine 4 %), les variations de l'insulinémie portale du rat receveur étaient plus marquées et se différenciaient notablement de ces résultats très compacts. On peut donc penser à l'intervention d'une action inhibitrice.

Crespin et coll. en 1969, observant chez le chien que l'injection d'acides gras libres provoquait une libération d'insuline qui n'apparaît pas lorsqu'on élève le taux

sanguin des AGL en quantité similaire mais par l'ingestion d'acides gras et l'administration d'héparine, ont émis l'hypothèse de l'existence d'un facteur intestinal. Ce facteur inhiberait de façon directe ou indirecte la libération de l'insuline. S'il semble logique que le passage du glucose dans le tube digestif soit précédé par un médiateur hormonal avertissant le pancréas de sécréter de l'insuline au moment de l'arrivée de ce sucre dans la circulation, on peut également trouver logique qu'un phénomène analogue mais d'effet opposé soit déclenché lors de l'ingestion de lipides ou de glycérol. L'inhibition de la sécrétion de l'insuline lors de l'administration de ces substrats paraît en effet judicieuse. L'insuline possède une action anti-lipolytique et sa présence en quantité importante lors d'une élévation des AGL aurait pour conséquence de favoriser le stockage de ces substrats, au lieu de les utiliser comme ressource énergétique. De même,l'utilisation cellulaire du glycérol est indépendante de l'insuline (Doershuk 1951). Une libération de l'insuline lors d'un apport exogène de glycérol favoriserait l'utilisation du glucose en lieu et place de celle de glycérol. On peut donc, d'un point de vue finaliste, trouver judicieux que les lipides alimentaires, par l'intermédiaire du tube digestif, inhibent la libération d'insuline. Ainsi, ils seront utilisés préférentiellement au glucose par les.

cellules de l'organisme, plutôt que d'être stockés comme réserve, alors qu'ils constituent l'apport énergétique du moment.

La gestion des ressources énergétiques, à la lumière de ces données, étayées par les expériences dans le système du rat donneur - rat receveur, peut être envisagée comme complexe. La sécrétion de l'insuline, stimulée par le passage entérique du glucose ou de l'arginine, favoriserait leur utilisation sans puiser dans les réserves de l'organisme. La sécrétion de l'insuline, inhibée par le passage de corps gras dans le tube digestif, aboutirait au même résultat puisque ce serait l'apport calorifique du moment qui serait utilisé sans que soient entamées les réserves.

* * *

3. ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DU FACTEUR DUODENAL INSULINOTROPE

Dans un premier groupe d'expériences (chapitre IV, 1, 2, 3) nous avons étudié la modulation par divers aliments (glucose, acides aminés, huile d'arachide) d'un facteur intestinal agissant sur la sécrétion de l'insuline. Les expériences qui ont suivi, (chapitre IV, 4 et 5) avaient pour but de préciser certains aspects de l'apparition dans la muqueuse duodénale du DIRA et d'en connaître, par une méthode de purification, quelques unes des caractéristiques physico-chimiques.

* * *

Les résultats obtenus avec le 2-désoxy-D-glucose (2DG) (Fig. 23) ont montré que l'emploi de ce sucre supprimait l'apparition du premier pic (5 minutes) obtenu avec le glucose, alors que le deuxième pic (45 minutes) se manifestait de façon identique lors de l'administration de glucose ou de 2 désoxy-D-glucose. Au niveau de la cellule B, lors d'études menées avec le 2DG, Montaigue et coll. (1967) et Goldsmith et coll. (1970) ont montré que ce sucre s'opposait

à la libération de l'insuline induite par le glucose. Pour stimuler la cellule B le glucose doit donc être métabolisé "plus bas" que l'étape du glucose-6-phosphate, (Kilo et coll. 1962) puisque le 2DG est arrêté à cette étape et qu'il se montre alors inefficace dans la libération de l'insuline. Dans la muqueuse duodénale, la suppression du premier pic de DIRA lors de l'emploi de 2DG suggère que l'apparition de ce premier pic est tributaire soit d'un catabolite du glucose, soit d'une réaction ou de l'énergie qu'elle fournit, qui se situent à un niveau plus avancé dans le catabolisme du glucose que l'étape du glucose-6-phosphate. En revanche, il ne semble pas que le métabolisme du glucose soit nécessaire à l'apparition de deuxième pic de DIRA (45 minutes), puisque nous avons observé un pic de DIRA 45 minutes après l'administration orale de 2DG, comparable à celui obtenu avec le glucose au même temps.

Cette observation de la différence de l'utilisation du glucose dans l'apparition du DIRA suggère l'existence, soit de plusieurs facteurs intestinaux insulinotropes, soit d'un seul facteur mais qui possèderait des mécanismes différents d'activation et de libération. Il est possible de concevoir l'existence de deux (ou plusieurs) facteurs duodénaux qui, différemment sensibles aux aliments, auraient pour rôle de stimuler de manière variable la sécrétion de

l'insuline. L'un de ces facteurs, dont la manifestation apparaît 5 minutes après l'administration orale de glucose, utiliserait ce sucre à une étape avancée de son métabolisme. Un autre facteur, qui se manifesterait 45 minutes après le glucose, utiliserait la molécule intacte de ce sucre ; l'administration de 2DG ou de glucose aboutirait donc à la même stimulation de DIRA pour le deuxième facteur, alors que ce ne serait pas le cas pour le premier facteur.

Cette hypothèse de plusieurs facteurs duodénaux insulinotropes différents a été renforcée par les résultats obtenus avec l'actinomycine D (Fig. 24, 25). En effet, le traitement des rats donneurs avec l'actinomycine D, avant l'administration de glucose, a provoqué une disparition dans la muqueuse duodénale du premier pic (5 minutes) et non du second (45 minutes) (Fig. 24). Le traitement à l'actinomycine D n'a pas modifié l'activité de la muqueuse duodénale du rat à jeun puisque de tels rats, traités ou non avec ce produit, possèdent dans leur muqueuse duodénale, une activité insulinotrope identique. Cet antibiotique, qui inhibe la synthèse protéique a,par contre, montré que le pic 5 minutes devait dépendre d'un tel mécanisme de synthèse, ce qui n'est pas le cas pour le second pic (45 minutes).

Ces résultats concordent avec l'hypothèse que nous avions avancée lors de la discussion de l'inhibition du pre-

mier pic dans la muqueuse duodénale avec le 2 désoxy-D-glucose. Si un mécanisme de synthèse intervient dans l'apparition du pic 5 minutes, il va utiliser de l'énergie. Cette énergie pourrait lui être fournie par le glucose, qui justement doit être métabolisé pour activer le DIRA à ce moment-là. En revanche, ni catabolisme du glucose ni synthèse protéique n'interviennent dans la stimulation du DIRA à 45 minutes.

D'autre part, le fait de prétraiter à l'actinomycine D des rats qui reçoivent par voie intragastrique de l'arginine, a fait disparaître toute activité insulinotrope dans leur muqueuse duodénale (Fig. 25). Or, nous avions obtenu avec l'arginine (Fig. 18) une activité duodénale insulinotrope biphasique, montrant des maxima 5 et 30 minutes après l'administration de cet acide aminé. Puisque la muqueuse duodénale ne présente plus, après traitement à l'actinomycine D, d'activité insulinotrope suite à l'ingestion d'arginine, on peut penser que des phénomènes de synthèse protéique interviennent dans l'apparition du premier (5 minutes) et du second pic (30 minutes). Nous pouvons faire un rapprochement entre le pic glucose 5 minutes et les pics arginine 5 et 30 minutes,puisque tous les trois disparaissent si l'on traite les animaux avec un inhibiteur de la synthèse protéique. Ce n'est pas le cas pour le pic glucose 45 minutes.

On peut supposer qu'il existe deux mécanismes différents de stimulation du DIRA, dont l'un serait responsable de l'activité insulinotrope qui apparaît 5 minutes après le glucose et 5 et 30 minutes après l'arginine, alors que l'autre assurerait la stimulation ou l'activation du DIRA mis en évidence 45 minute après le glucose.

Le fait qu'un inhibiteur de synthèse protéique supprime l'apparition de pics précoces de DIRA dans la muqueuse duodénale, suggère que le mécanisme impliqué dans l'apparition du DIRA est dû à l'activation d'un pré-facteur passant par une étape utilisant une transcription DNA-RNA, plutôt qu'à une synthèse protéique complète, qui nécessiterait plus de quelques minutes. On peut supposer qu'il s'agit soit de l'adjonction de quelques acides aminés soit d'une modification dans la structure tertiaire ou quaternaire de la molécule, par clivage et/ou par soudure. Cette hypothèse est renforcée par le fait que, dans la muqueuse de rats à jeun, nous avons mis en évidence une activité insulinotrope plus élevée que dans la muqueuse de rats nourris (Fig. 12). On peut envisager qu'il existe une synthèse continue de DIRA dans la muqueuse ; le DIRA s'accumulerait chez le rat à jeun, alors qu'il serait utilisé continuellement chez le rat qui mange. Si un phénomène de synthèse rapide existait (moins de 5 minutes) il serait difficile d'ex-

pliquer cette augmentation du DIRA chez le rat à jeun.

Nous avons pu préciser, par le système de purification employé, quelques caractéristiques du DIRA. Ce facteur s'absorbe sur la poudre de verre et se comporte comme un petit polypeptide d'un PM compris entre 2000 et 20'000. Les fractions 1, 2 et 3 (Fig. 26) présentent encore une certaine activité insulinotrope mais la grande partie de cette activité se retrouve dans la fraction 4. En augmentant la quantité de poudre jusqu'à 200 mg / ml d'extrait duodénal., nous avons obtenu dans la fraction 4 une activité insulinotrope qui est supérieure,à quantité égale, à celle de l'extrait non purifié (Tableau 11). Cet extrait, qui se trouve sous forme de poudre à la dernière étape de la purification, peut donc être utilisé sous forme plus concentrée et servir de point de départ à d'autres méthodes d'extraction ou de purification plus complexes.

Nous avons,d'autre part, mis en évidence la sensibilité du DIRA à un traitement à température élevée, puisque les extraits soumis à 100° C pendant quelques minutes ont perdu toute activité insulinotrope (Tableau 11).

* * *

4. EXPERIENCES AVEC LE GLIBENCLAMIDE

Lors des administrations orales de glibencla - mide chez le rat (Fig. 27, 28) nous avons obtenu une stimulation rapide (30 secondes) du DIRA, suivie d'une chute aussi rapide, qui pourraient faire penser à la brusque activation puis à la vidange d'un pool de DIRA préformé.En effet,nous ne mesurons qu'une activité insulinotrope faible au temps O, alors que 30 secondes après le glibenclamide,cette activité a presque quadruplé. Une synthèse complète d'un facteur polypeptidique semble impossible dans un laps de temps aussi bref. Par contre, le second pic de DIRA,35 minutes après le gli - benclamide, qui obéit à une cinétique voisine de celle mise en évidence avec le glucose 45 minutes, pourrait être le résultat d'une synthèse protéique. Pourtant, dans une situation semblable,après l'administration de glucose,l'emploi d'un inhibiteur de synthèse, l'actinomycine D, n'avait pas modifié l'apparition du pic glucose 45 minutes.

Après l'administration de glibenclamide par voie orale à l'homme, nous avons mesuré des variations de DIRA dans les extraits de muqueuse, qui correspondent, sur une échelle de temps plus longue, à ce que nous avons observé chez le rat. Le premier pic de DIRA est apparu 15 minutes

après le glibenclamide (Fig. 31). Ce décalage de temps - par rapport à la valeur 30 secondes obtenue chez le rat - provient vraisemblablement d'une différence dans la durée de la vidange gastrique entre l'homme et le rat. Lorsque nous avons administré, grâce au duodénoscope, le glibenclamide au niveau duodénal, nous avons mesuré une activité insulinotrope élevée, moins de 3 minutes plus tard (Fig 32). L'action du glibenclamide sur la muqueuse duodénale humaine ou de rat est donc extrêmement rapide.

La cinétique de l'augmentation puis la chute du DIRA dans le duodénum correspond à ce que nous avons observé, au niveau périphérique, dans le sang des sujets, en mesurant les variations de leurs taux d'insuline et de glucose. Les maxima de DIRA ont été décelés avant toute modification périphérique de l'insulinémie ou de la glycémie. De plus, l'insuline augmente dans la circulation avant qu'un taux sanguin de glibenclamide soit suffisant pour expliquer à lui seul cette libération d'insuline (Fig. 30). On constate donc que l'absorption de glibenclamide n'est nécessaire ni pour stimuler la libération d'insuline ni pour augmenter le DIRA dans la muqueuse duodénale. Le rôle premier du glibenclamide serait d'activer un transmetteur duodénal qui stimulerait la libération d'insuline. Cette hypothèse avait déjà été formulée en 1969 par Heptner et coll. qui en admi-

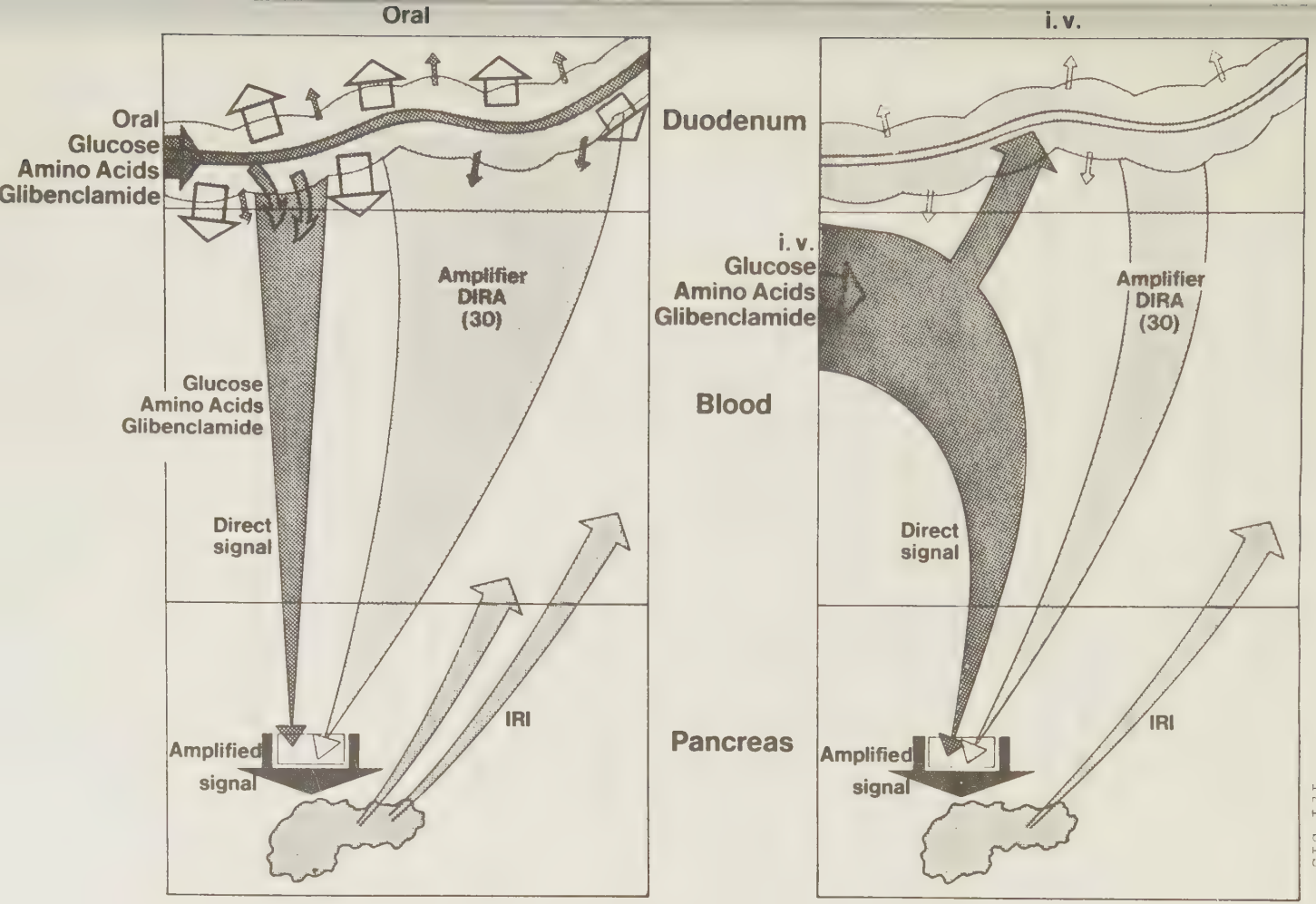
nistrant par voie orale du glibenclamide chez le chien, ont montré que l'insulinémie atteignait son maximum au même moment que lors de l'administration de ce produit, en dose identique, mais par voie veineuse. Si le pancréas était l'organe cible du glibenclamide, ce produit éléverait l'insulinémie plus rapidement lors de son administration par voie veineuse que par voie orale. Heptner et coll. (1969) sur la base des travaux de Kellner et coll. (1969) et Hellmann et coll. (1969), montrant l'affinité élevée de la muqueuse intestinale pour le glibenclamide, ont supposé que cette sulfonylurée possédait une action non seulement sur le pancréas - action bien connue (Loubatières 1974) - mais également, et peut-être en premier lieu sur un transmetteur intestinal. Ce transmetteur (DIRA) aurait, au niveau pancréatique, un rôle de sensibilisateur de l'effet insulinotrope du glibenclamide. Cet effet de sensibilisation ou d'amplification a été vérifié par l'expérience relatée au chapitre IV, 7. Une quantité de 200 ng de glibenclamide, dissoute dans du plasma de rat à jeun et injectée chez le rat receveur, n'a pas libéré une quantité d'insuline différente de celle de l'injection de plasma seul. En revanche, lorsque la même quantité de glibenclamide est dissoute dans du plasma de rats ayant reçu 15 minutes auparavant 0,2 mg / kg de ce produit par voie orale et qu'elle est injectée chez le rat receveur, il s'ensuit une libération

d'insuline qui est 5 fois plus élevée que celle qui suit l'injection de ce même plasma sans glibenclamide. La concentration de glibenclamide dans le plasma, 15 minutes après son administration par voie orale, était voisine de 1 ng/ml; cette faible concentration ne peut être responsable de l'effet observé. Il semble donc qu'il existait dans le plasma des rats prétraités au glibenclamide, un facteur qui a sensibilisé (amplifié) l'effet direct du glibenclamide sur le pancréas.

Cet effet de sensibilisation ou d'amplification de l'action insulinotrope d'un composé, qui par lui-même stimule la cellule B, a déjà été observé par plusieurs auteurs. En 1913 Bang montrait que l'administration par voie orale de plusieurs doses consécutives de glucose ne produisait pas des glycémies comparables et que dès la deuxième administration de ce sucre, il n'obtenait que de faibles variations dans les taux sanguins de glucose. Staub en 1921 puis Traugott en 1922 ont également remarqué qu'une première administration de glucose per os accélérait l'utilisation d'une seconde administration de ce sucre. Adlersberg et Porges en 1926, ont obtenu des résultats qui semblaient contredire les expériences précédentes sur ce qui a été appelé l'effet Staub. Ces auteurs ont administré par voie veineuse 25 - 50 g de glucose pour faire prendre par voie orale, après 60 minutes,

100 g de ce sucre. L'effet Staub n'est pas apparu. Un premier passage du glucose par le tube digestif semble donc nécessaire pour qu'apparaisse un effet de sensibilisation. Quelques auteurs ont suggéré que l'effet Staub serait dû à un facteur intestinal qui, libéré par le passage entérique du glucose, stimulerait la libération d'insuline de façon plus rapide et plus marquée que ne le ferait le glucose seul (Somer - salo 1950 ; Dupré 1964 ; Elrick et coll. 1964 ; Perley et Kipnis 1967). Nous retrouvons là la définition de l'axe en - téro-pancréatique que nous avions donnée au début de cette discussion.

Les expériences avec le sang de rats prétraités oralement au glibenclamide confirment l'effet Staub, qui trouverait une explication dans la libération du DIRA à la suite de l'ingestion d'aliments. La concentration élevée des aliments dans le tube digestif libérerait le DIRA dans la circulation où, de concert avec une glycémie normale, il stimulerait déjà la production d'insuline. On peut parler d'un rôle amplificateur du DIRA, puisque l'injection de glibenclamide seul, pas plus que celle de plasma seul ne libèrent d'insuline, alors que la combinaison des deux aboutit à une sécrétion importante de cette hormone (Fig. 33). Le tableau suivant (13) schématise le rôle du DIRA comme amplificateur.



D'après Heptner et coll.(1976) Tableau 13

F. ESSAI D'IDENTIFICATION DE L'ACTIVITE DUODENALE INSULINOTROPE

Le processus de purification appliqué à l'extrait duodénal nous a montré que l'activité insulinotrope mise en évidence dans le duodénum se comportait comme un petit polypeptide. L'action du DIRA présente des analogies avec celle d'hormones gastro-intestinales rapportées dans la littérature. S'agit-il d'une hormone gastro-intestinale connue ou d'un nouveau candidat au titre d'hormone ? Les hormones gastro-intestinales actuellement reconnues comme telles ont toutes été supposées jouer ce rôle insulinotrope observé chez le rat receveur.

A. La Sécrétine

La sécrétine a été la première hormone soupçonnée d'avoir cette activité duodénale insulino-libératrice. Chisholm et coll. (1971) ont montré que les taux sanguins de sécrétine augmentent après le glucose oral. Cette hormone pouvait donc être le DIRA puisque nous avons observé une augmentation de l'activité insulinotrope après le glucose. Pourtant les résultats obtenus par Chisholm n'ont pas

été répétés (Boehm et coll. 1973 ; Boden et coll. 1974). Buchanan (1973) observe même une chute des taux de sécrétine après le glucose.

D'autre part, il est connu que l'acidification duodénale est le stimulus physiologique de la libération de sécrétine (Wang et Grossman 1951 ; Boden 1974). Or, l'acidification duodénale provoquée par le passage de l'estomac au duodénum d'une solution de NaCl 0,9 % ne fait pas varier le contenu de la muqueuse duodénale en activité insulinotrope.

De plus, le rôle insulinotrope de la sécrétine est mis en doute après les observations de Turner (1969) et de Hinz (1971). Nous avons également observé avec de la sécrétine hautement purifiée (GIH) ou synthétique (Hoechst) que cette hormone, à des doses pharmacologiques (20 unités cliniques), ne stimulait pas de libération d'insuline.

Enfin, les taux circulant de sécrétine chez l'homme sont de l'ordre de 10 pg / ml (Bloom 1974). Cette quantité correspond à 0,002 unités de sécrétine. Or la stimulation que nous avons observée avec la sécrétine Novo était provoquée par l'injection de 20 unités de sécrétine. Cette quantité de sécrétine n'est pas physiologique et il est douteux qu'une telle quantité se trouve dans notre extrait 5 minutes après le glucose, extrait qui stimule la

cellule B de façon comparable à la stimulation obtenue avec 20 unités de sécrétine.

Il a été démontré récemment (Boden et coll. 1975), que la somatostatine (somatotropin-release-inhibiting factor = SRIF) inhibait la libération de sécrétine immunoréactive. Or, la somatostatine, en doses variables, supprime l'activité duodénale insulinotrope (DIRA) après le glucose (Schindler et coll. 1976). Le mécanisme par lequel la somatostatine inhibe les différentes sécrétions hormonales n'est pas connu avec certitude, mais il semble que cette inhibition se situe au-delà du système de l'AMPc. A ce niveau, la spécificité hormonale n'intervient plus et l'inhibition de la sécrétine et du DIRA provoquée par la somatostatine ne peut avoir de commun qu'une réaction métabolique intervenant dans une étape ultérieure (Assan et coll. 1975).

En résumé, la sécrétine ne semble pas être responsable de l'activité duodénale insulinotrope et il est peu probable qu'elle intervienne à un moment ou à un autre dans la stimulation de la cellule B observée.

B. Cholécystokinine- pancréozymine (CCK-PZ)

La CCK-PZ pourrait-elle être l'hormone impliquée dans la stimulation/inhibition par les aliments de l'activi-

té duodénale insulinotrope ?

La CCK-PZ se trouve dans le duodénum et le jéjunum ; elle est libérée principalement par les acides aminés et les graisses et très peu par le glucose (Sum et coll. 1967). Or, le DIRA est stimulé principalement par le glucose et certains acides aminés alors que les graisses l'inhibent.

Nous avons observé (Chapitre III, 3) lors de l'injection de 10 unités de CCK-PZ (GIH) une importante libération d'insuline. Cette action insulinotrope ne semble pas devoir être attribuée à la CCK-PZ elle-même, puisque lors de la stimulation de la production endogène de cette hormone on n'observe pas de libération d'insuline (Grayburn et coll. 1975). L'effet insulinotrope des préparations de CCK-PZ semble dû en partie du moins à d'autres polypeptides, tels le GIP (Rabinovitch et Dupré 1974), contenus comme impuretés dans les préparations utilisées.

La CCK-PZ n'est donc probablement pas identifiable à l'activité duodénale insulinotrope.

C. La Gastrine

La source principale de gastrine se situe dans l'estomac et l'on ne trouve pas ou très peu de cellule sé-

crétant la gastrine dans le duodénum.

L'action insulinotrope de la gastrine est d'autre part mise en doute quant à sa réalité physiologique. Chez le chien, une quantité physiologique de gastrine ne stimule pas la libération de l'insuline (Unger et coll. 1967). Chez l'homme, l'ingestion de glucose fait varier les taux de gastrine de façon insuffisante pour expliquer l'accroissement des taux d'insuline observés (Rehfeld et Stadil 1973). La gastrine ne peut donc pas être le facteur duodénale insulinotrope (DIRA) que nous avons étudié.

D. Gastric Inhibitory polypeptide (GIP)

Le GIP est sécrété par les cellules D_1, localisées dans le duodénum et dans le jéjunum. Il stimule la libération d'insuline en présence (Dupré et coll. 1973) ou en l'absence de glucose (Brown 1974). Les taux de GIP augmentent après un repas (Kuzio et coll. 1974) ou après du glucose (Cataland et coll. 1974). Le GIP semble donc être un candidat sérieux au rôle de DIRA. Pourtant Falko et coll.(1975) montrent que le GIP augmente de façon significative après l'absorption d'huile de maïs. Or, le DIRA est inhibé par l'administration orale d'huile. De plus, Bloom (1975) n'observe aucune corrélation entre les taux de GIP et ceux d'in-

suline après une surcharge orale de glucose. Le GIP ne remplit donc pas toutes les conditions pour s'identifier au DIRA. Il peut par contre participer à la réponse insulinotrope du duodénum au glucose.

E. Le Glucagon-like immunoreactivity (GLI)

Le GLI est localisé principalement dans la partie supérieure du jéjunum (Polak et coll. 1971). Sa sécrétion est stimulée par le passage entérique de différents sucres et de graisses (Samols et coll. 1965 ; Böttger et coll. 1973). Le GLI ne semble pas apte à participer à la stimulation insulinotrope par le glucose : d'une part, sa localisation est différente de celle du DIRA et d'autre part, à l'inverse du DIRA, sa libération est induite par les graisses.

De plus, chez l'homme traité à la phenformine, traitement qui ralentit l'absorption des sucres, une charge orale de glucose fait augmenter de façon significative les taux de GLI, sans faire varier ceux d'insuline (Shima et coll. 1975).

F. Motiline, Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) et sérotonine :

Ces deux premiers polypeptides ne sont pas à considérer comme candidats au rôle de DIRA puisque ni l'un ni l'autre n'ont un effet marqué sur la libération de l'insuline (Turner et coll. 1974).

On a montré récemment que la sérotonine se liait à la molécule d'insuline, ce qui pourrait expliquer l'action inhibitrice de cette hormone sur la libération d'insuline et permettrait du même coup de la rayer de la liste des candidats au rôle de DIRA (Barath 1975).

G. L'IRP (insulin releasing polypeptide) :

L'IRP, isolé et purifié par Turner et coll. (1972), possède certaines ressemblances dans son action insulinotrope avec le GIP et le DIRA. On ne peut pas pour l'instant identifier l'IRP au GIP (Turner et coll. 1974). D'autre part, on connaît encore mal tous les composants alimentaires stimulant la libération de l'IRP. Il est donc difficile de comparer IRP et DIRA.

Il apparaît qu'aucune hormone gastro-intestinale puisse, pour l'instant, s'identifier à l'activité duodénale

insulinotrope (DIRA). Certaines de ces hormones ou de ces candidats au titre d'hormone présentent avec le DIRA, des ressemblances dans leur action ou leur mécanisme de libération. Il est plausible d'admettre, à la suite de Track - étude de l'évolution des hormones gastro-intestinales(1973) - une similitude de comportement basée sur la similitude de structure.

* * *

VI - CONCLUSION

Nous avons analysé tout au long des chapitres précédents le comportement d'une activité duodénale insulinotrope (DIRA) face à différents composants alimentaires. Cette étude, dont les résultats sont résumés dans le tableau 14, a montré que ce ou ces facteurs intestinaux sont sensibles non seulement à la qualité mais également à la quantité de nourriture ingérée.

Son rôle sur les cellules B du pancréas paraît être double. D'une part, le DIRA stimule la libération de l'insuline, même en l'absence de glucose; il possède une fonction insulinotrope. D'autre part, le DIRA sensibilise le pancréas aux substrats alimentaire : c'est une fonction d'amplificateur.

La mise en évidence du DIRA dans la muqueuse duodénale et indirectement dans la circulation et le fait qu'il possède une fonction insulinotrope et d'amplificateur, le pose comme candidat sérieux au rôle de transmetteur entéro-insulaire. Pourtant, si quelques unes de ses propriétés physico-chimiques ont été précisées,on ne peut pas,pour l'instant, l'identifier à l'une ou à l'autre hormone intestinale connue.

* * *

Tableau 14 SENSIBILITE DE L'ACTIVITE DUODENALE INSULINO-LIBERATRICE (DIRA) FACE A DIVERS ALIMENTS

PRODUIT ADMINISTRE	ACTION APRES :	½	2	5	15	30	45	60	90 minutes
GLUCOSE	2 g / kg		++++	++++	+	+/-	+++++	+++++	+++
GLUCOSE	0,5 g / kg		+++						
GLUCOSE	0,1 g / kg		++						
2-DESOXY-D-GLUC.	2 g / kg			+	+	+	+++++	+	
GLUCOSE + ACTIN.	2 g / kg			+	+	+	+++++	++++	
NESMIDA	2 g / kg			++	+++	+++	++	++	
ARGININE	2 g / kg			+++++	+++	++++	++++	++	
LYSINE	2 g / kg			++	++	++	+++	++	
ARGININE + ACTIN.	2 g / kg			+	+	+	+	+	
HUILE	2 g / kg			+	++	-	-	-	
GLYCEROL	2 g / kg			+	++	-	-	-	
PALMITATE	0,8 g / kg			+	++	++	++	++	
GLIBENCLAMIDE	0,02 mg / kg	+++	+	+	+	+++	++	+	+

VII BIBLIOGRAPHIE

I REFERENCES

Anderson E.,J.A.Long
The effect of hyperglycemia on insulin secretion as determined with the isolated rat pancreas in a perfusion apparatus.
Endocr. 40 : 92 - 97 (1947)

Assan R.,A.Basdevant,A.Selmi
Somatostatine et diabète.
Journées annuelles de diabétologie de l'Hôtel Dieu.
Flamarion,Paris 23 - 24 (1975)

Balsano F.,G.Pitucco,A.Musca,V.Di Noto
New interpretation of oral glucose tolerance.
Lancet II 865 (1964)

Bänder A.,W.Pfaff,K.Ritter,A.Wohlfahrt,F.H.Schmidt
Zur Pharmacologie von H B 419.
in HB 419 Tegernsee-Konferenz,
Farbwerke Hoechst AG (1969)

Bang J.
Der Blutzucker.
in Wiesbaden 1913 cité par Staub H. 1921

Barath P.

New aspect of the role of serotonine in the insulin release mechanism.

Acta Diab.Lat. XI 4 : 315 - 329 (1975)

Bastenie P.,V.Conard,J.R.M.Frankson,R.Bellens,J.Christophe.

Augmentation de l'insuline tissulaire et de l'insuline circulante après ingestion de glucose.

Acta Clin.Belg. 13 : 32 - 39 (1958)

Bayliss W.M.,E.H.Starling.

The mechanism of pancreatic secretion.

J.Physiol.(London) 28 : 325 - 353 (1902)

Biedl A.,R.Kraus.

Ueber intravenöse Trauberzuckerinfusionen an Menschen.

Wien.Klin.Wschr. 4 : 55 - 58 (1896)

Bloom S.

Lettre au Prof. Felber (1974)

Boden G.,N.Essa,O.E.Owen,F.A.Reichle.

Effects of intraduodenal administration of HCl and glucose on circulating immunoreactive secretine and insulin concentrations.

J.Clin.Invest. 53 : 1185 - 1193 (1974)

Boden G.,M.C.Sivitz,O.E.Owen.
Somatostatin suppresses secretin and pancreatic exocrine secretion.
Science 190 : 164 - 165 (1975)

Boehm M.,A.Oliali,W.Y.Chey.
The production of specific anti-secretin sera and its use in the radioimmunoassay of secretin.
Gastroenterology 64 : 703 (1973)

Böttger I.,R.Dobbs,G.R.Faloona,R.H.Unger.
The effects of triglyceride absorption upon glucagon, insulin and gut glucagon-like immunoractivity.
J.Clin.Invest. 52 : 2532 - 2541 (1973)

Bringolf M.,N.Zaragoza,D.Rivier,J.P.Felber.
Pyruvate metabolism in diaphragm from fat-fed rats.
Eur.J.Biochem. 26 : 360 - 367 (1972)

Buchanan K.D.
Gut and islet hormones in diabetes.
Post.Med.J. 49 : 117 - 121 (1973)

Buchanan K.D.
cité par Creutzfeld in
N.Engl.J.Med. 288 : 1238 - 1239 (1973)

Carroll K.F.,J.P.Nestel
Effect of long-chain triglyceride on human insulin secretion.
Diabetes 21 : 923 - 929 (1972)

Cataland S.,S.E.Crockett,J.C.Brown,E.L.Mazzaferri.
Gastric inhibitory polypeptide (GIP)stimulation by oral glucose in man.
J.Clin.Endocr.Metab. 39 : 223 - 228 (1974).

Chisholm D.J.,J.D.Young,L.Lazarus
The gastrointestinal stimulus to insulin release.
J.Clin.Invest. 48 : 1453 - 1460 (1969).

Chisholm D.J.,E.W.Kraegen,J.D.Young,L.Lazarus
Comparaison of secretin release to oral intraduodenal or intravenous glucose administration.
Horm.Metab.Res. 3 : 180 - 183 (1971)

Conard V.,J.R.M.Franckson,P.A.Bastenie,J.Kestens, L.Kovacs.
Etude critique du triangle d'hyperglycémie intraveineux chez l'homme normal et détermination d'un "coefficient d'assimilation glucidique ".
Arch.Int.Pharmacodyn. 93 : 277 - 292 (1953).

Coran A.G.,P.E.Cryer,D.L.Horwitz.
Effects of intravenously administred fat on serum insulin levels.
Am.J.Clin.Nutr. 25 : 131 - 134 (1972)

Crespin S.R.,W.B.Greenough,D.Steinberg.
Stimulation of insulin secretion by infusion of free fatty acids.
J.Clin.Invest. 52 : 1934 - 1943 (1969)

Crespin S.R.,W.B.Greenough,D.Steinberg.
Stimulation of insulin secretion by long-chain free fatty acids.
J.Clin.Invest. 52 : 1979 - 1984 (1973)

Curry D.L.,L.L.Bennett,G.M.Grodski.
Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Endocr. 83 : 572 - 584 (1968)

Dick J.,J.P.Felber.
Specific hormonal regulation by food on the pancreas enzymatic (amylase and trypsin) secretions.
Horm.Metab.Res. 7 : 161 - 166 (1975)

Doerschuk A.P.
Some studies on the metabolism of glycerol-1-C^{14}.
J.Biol.Chem. 139 : 39 - 44 (1951)

Dubowski K.M.

An O-toluidine method for body-fluid glucose determination.

Clin.Chem. 8 : 215 - 235 (1962)

Duncombe W.G.

The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids.

Biochem.J. 88 : 7 - 10 (1963)

* voir XVII

Dupré J.

An intestinal hormone affecting glucose disposal in man.

The Lancet I : 672 - 673 (1964)

Effendic S.,E.Cerasi,R.Luft.

Rolе of glucose in arginine-induced insulin release in man.

Metabolism 20 : 568 - 579 (1971)

Elrick H.,L.Stimmler,C.J.Hlad,Y.Arai.

Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration.

J.Clin.Endocr. 24 : 1076 - 1082 (1964)

Fabre J.

in Proceedings of the Geneva 1973 XII international therapeutic union congress.

Medecine & Hygiène Geneva : p 201 (1974)

Falko J.M.,S.E.Crockett,S.Cataland,E.L.Mazzaferri.
Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulated by fat ingestion in man.
J.Clin.Endocr.Metab. 41 : 260 - 265 (1975)

Fischer U.,H.Hommel,M.Ziegler,R.Michael.
The mechanism of insulin secretion after oral glucose administration.
Diabetologia 8 : 104 - 110 (1972)

French J.W.,D.Baum,D.Porte
Multiphasic insulin response to arginine.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 137 : 858 - 860 (1971)

Goetz F.C.,J.W.Maney,B.Z.Greenberg.
An extrapancreatic mechanism for insulin release
J.Lab.Clin.Med. 62 : 877 (1963)

Goldsmith S.J.,R.S.Yalow,S.A.Berson.
Effects of 2-deoxy-D-glucose on insulin-secretory responses to intravenous glucose,glucagon,tolbutamide and arginine in man.
Diabetes 19 : 453 - 457 (1970)

Grayburn J.A.,R.F.Harvey,R.D.Jennings,L.Dowsett,M. Hartog.
Relatioship between changes of serum CCK-PZ and serum insulin after different stimuli.
Diabetologia 11 : 35 - 38 (1975)

Grenier J.F.,M.Gillet,J.Kachelhoffer,P.Wong,A.M.Barath, A.J.Moody,A.Schaich-Fries,F.Sunby,A.G.Weiss.
Circulation extra-corporelle couplée d'intestin et de pancréas chez le chien.
Mise en évidence d'un pouvoir insulino-stimulant de l'intestin.
Comptes Rendus Soc.Biol. 162 : 1405 - 1410 (1969)

Hadjikhani H.,J.Fasel,J.P.Felber,A.Vanotti.
Etude sur l'activité insulino-sécrétrice de la muqueuse duodéno-jéjunale.
Exc.Med.Intern.Congress 140 : 186 (1967)

Hadjikhani H.,J.Fasel,J.P.Felber.
Facteurs de la muqueuse duodénale influençant la sécrétion insulinique.
Schw.Med.Wschr. 100 : 1005 - 1009 (1970)

Hales C.N.,P.J.Randle.
Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipited.
Biochem.J. 88 : 137 - 146 (1963)

Hellman B.,L.A.Idahl,H.Tjâlve,A.Danielson,A.Lernmark.
Beobachtungen zum Wirkungsmachanismus des hypoglykämisch Wirksamen Sulfonylharnstoff-Präparates HB 419.
Drug Research 19 : 1472 - 1476 (1969)

Heptner W.,O.Christ,W.Rupp,H.M.Kellner.
Pharmacokinetics of a new highly effective hypoglycaemic sulfonylurea derivative.
Acta Diab.Lat. VI suppl. 1 : 105 - 115 (1969)

Hinz M.,N.Katsilambros,B.Schweitzer,S.Raptis,E.F.Pfeiffer
The role of the exocrine pancreas in the stimualtion of insulin secretion by intestinal hormones.
Diabetologia 7 : 1 - 5 (1971)

Hultman E.
Rapid specific method for determination of aldosaccharides in body fluids.
Nature 183 : 108 - 109 (1959)

Janbon M.,J.Chaptal,A.Vedel,J.Schaap.
Accidents hypoglycémiques graves par un sulfamidothiodiazol (le VK ou 2254 R.P.).
Montpellier Med. 2122 : 441 - 444 (1942)

Kellner H.M.,O.Christ,W.Rupp,W.Heptner.
Resorption,Verteiligung und Ausscheidung nach Gabe von ^{14}C markierten HB 419 an Kaninchen,Ratten und Hunde.
Drug Res. 19 : 1388 - 1404 (1969)

Kilo C.,C.L.Long,R.M.Bailey,M.B.Koch,L.Recant.
Studies to determine whether glucose must be metabolised to induce insulin release.
J.Clin.Invest. 41 : 1372 - 1373 (1962)

Loew E.R.,J.S.Gray,A.C.Ivy.
Is a duodenal hormone involved in carbohydrate metabolism ?
Am.J.Physiol. 129 : 659 - 663 (1940)

Loubatières A.
Therapeutic modification of islet function.
Handbook of physiology 7 : 653 - 664 (1972)

Matchinski F.M.,J.E.Ellerman.
Metabolism of glucose in the islets of Langerhans.
J.Biol.Chem. 243 : 2730 - 2736 (1968)

McIntyre N.,C.D.Holdsworth,D.S.Turner.
New interpretation of oral glucose tolerance.
The Lancet I : 20 - 21 (1964)

McIntyre N.,C.D.Holdsworth,D.S.Turner.
Intestinal factors in the control of insulin secretion.
J.Clin.Endocr. 25 : 1317 - 1324 (1965)

McIntyre N.,D.S.Turner,C.D.Holdsworth.
Intestinal factors and insulin secretion.
Diabetologia 1 : 73 (1965)

Montague W.,S.L.Howell,K.W.Taylor.
Pentitols and the mechanism of insulin release.
Nature 215 : 1088 - 1089 (1967)

Moore B.,E.S.Edie,J.H.Abram.
On the treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membrane.
Biochem.J. 1 : 28 - 38 (1906)

Perley M.J.,D.M.Kipnis.
Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose : studies in normal and diabetic subjects.
J.Clin.Invest. 46 : 1954 - 1962 (1967)

Polak J.M.,S.Bloom,I.Coulling.A.G.E.Pearse.
Immunofluorescent localization of secretin in the canine duodenum.
Gut 12 : 605 - 610 (1971)

Rabinovitch A.,J.Dupré.
Insulinotropic and glucagonotropic activities in crude preparations of cholecystokinin - pancreozymin.
Clin.Res. 20 : 945 (1972)

Rabinovitch A.,J.Dupré.
Effects of the GIP present in impure CCK-PZ on plasma insulin and glucagon in the rat.
Endocrinology 94 : 1139 - 1144 (1974)

Raptis S.,K.E.Schröder,M.Schleyer,R.M.Rau,K.Forster, H.Ditschuneit,E.F.Pfeiffer.
Difference in insulin and growth hormone secretion after intravenous and intraduodenal administration of mixed amino acids in humans.
Diabetologia 6 : 61 (1970)

Raptis S.,J.Kissing,H.Dollinger,K.E.Schröder,E.F. Pfeiffer.
The effect of oral and intravenous administration of fat on thefunction of the endocrine and exocrine pancreas in man.
Exc.Med. 280 : 85 (1973)

Ratcliffe J.G.,C.R.W.Edwards.
The extraction of adrenocorticotrophin and arginine-vasopressin from human plasma by porous glass.
RIA method,Kirkahm & Hunter ed. : 502 - 512 (1970).

Rehfeld J.F.,F.Stadil.
The effect of gastrin on basal-and-glucose-stimulated insulin secretion in man.
J.Clin.Invest. 52 : 1415 - 1426 (1973)

Rehfeld J.F.,F.Stadil,H.Baden,K.Fischerman.
The enteral insulin-stimulation after Whipple's operation.
Diabetologia 11 : 207 - 210 (1975)

Renold A.E.

Insulin biosynthesis and secretion. - A still unsettled topic.

N.Engl.J.Med. 282 : 173 - 182 (1970).

Reyes-Leal B.,A.Castro,E.Bernal,O.Guardiola.

Le rôle du duodénum dans l'insulino-sécretion.

Sem.Hôp.Paris 22 : 1611 - 1617 (1973).

* voir XVII

Scow R.O.,J.Cornfield.

Quantitative relations between the oral and intravenous glucose tolerance curves.

Am.J.Physiol. 179 : 435 - 438 (1954).

Shima K.,N.Sawazaki,S.Morishita,S.Tarui,M.Nishikawa.

Effect of phenformin on the response of plasma intestinal glucagon-like immunoreactivity (GLI) to oral glucose in gastrectomized subjects.

Poc.Soc.Exp.Biol.Med. 150 : 232 - 236 (1975).

Somersalo O.

The Staub effect.

Acta Ped.Scand. suppl. 78 : 37 - 41 (1950).

Staub H.

Bahnung in intermedianen Zuckerstoffwechsel.

Bioch.Ztschr. 118 : 93 - (1921).

Stifel F.B.,R.H.Herman,N.S.Rosenweig.
Effect of inhibitors of protein synthesis on the adaptation of certain jejunal glycolytic and folate metabolizing enzymes to diet and sex steroids.
Bioch.& Biophys.Acta 237 : 484 - 489 (1971).

Strubbe J.H.,P.R.Bouman.
Insulin secretion in the unanesthetized rat during intravenous infusion and spontaneous oral ingestion of graded doses of glucose.
Acta Endocr.suppl. 199 : 298 (1975).

Sum P.T.,R.M.Preshaw.
Intraduodenal glucose infusion and pancreatic secretion in man.
The Lancet I : 340 - 341 (1967).

Track N.S.
Evolutionary aspects of the gastrointestinal hormones.
Comp.Bioch.Physiol. 45 B : 291 - 301 (1973).

Traugott K.
Über das Verhalten des Blutzuckerspiegels bei wiederholten un verschiedener Art enteraler Zuckerzufuhr und dessen Bedeutung für die Leberfunktion.
Klin.Wchnschr. I : 892 - 898 (1922).

Turner D.S.

Intestinal hormones and insulin release. In vitro studies using rabbit pancreas.

Horm.Metab.Res. 1 : 168 - 174 (1969).

Turner D.S.

The effect of amino acids and intestinal hormones on insulin release in vitro.

Diabetologia 5 : 57 (1969).

Turner D.S.,V.Marks.

Enhancement of glucose-stimulated insulin release by an intestinal polypeptide in rats.

The Lancet II : 1095 - 1097 (1972).

Turner D.S.,L.Etheridge.V.Marks,J.C.Brown,V.Mutt.

Effectiveness of the intestinal polypeptides IRP, GIP,VIP and motilin on insulin release in the rat.

Diabetologia 10 : 459 - 463 (1974).

Unger R.H.,H.Ketterer,A.M.Eisentraut.

Distribution of immunoassayable glucagon in gastro-intestinal tissues.

Metabolism 10 : 865 - 867 (1966).

Unger R.H.,A.M.Eisentraut.

Entero - insular axis.

Arch.Intern.Med. 123 : 261 - 266 (1969).

Unger R.H.,H.Ketterer,J.Dupré,A.M.Eisentraut.
The effects of secretin,pancreozymin and gastrin on insulin and glucagon secretion in anesthetized dogs.
J.Clin.Invest. 46 : 630 - 635 (1967).

Vagne M.,J.R.Armengol Miro,C.Desvigne,C.A.Bizollon, C.LeDonne.
Effect of secretin on insulin secretion in man.
Digestion 5 : 284 - 289 (1972).

Wang C.C.,M.I.Grossman.
Physiological determination of release of secretin and pancreozymin from intestin of dogs with transplanted pancreas.
Am.J.Physiol. 164 : 527 - 545 (1951).

Wick A.N.,D.R.Drury,H.I.Nakada,J.B.Wolfe.
Localisation of the primary metabolic block produced by 2-deoxy-D-glucose.
J.Biol.Chem. 224 : 963 - 969 (1957).

Yalow R.S.,S.A.Berson.
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J.Clin.Invest. 39 : 1157 - 1175 (1960).

Zaragoza N.,J.P.Felber.
Study of the metabolism in vitro of glucose in the rat epididymal fat tissue.
Diabetologia 5 : 284 - 292 (1969).

Zaragoza - Hermans N.,J.P.Felber.
Studies of the metabolic effects induced in the rat by a high fat diet. II Disposal of orally administred ^{14}C - glucose.
Horm.Met.Res. 4 : 25 - 30 (1972)

Zunz E.,J. La Barre.
Hyperinsulinémie consécutive à l'injection de solution de sécrétine non hypotensive.
C.R. Soc.Belg.Biol. 98 : 1435 - 1438 (1928).

* Dupré J.,J.D.Curtis,R.H.Unger,R.W.Waddel,J.C.Beck.
Effects of secretin,pancreozymin or gastrin on the response of the endocrine pancreas to administration of glucose or arginine in man.
J.Clin.Invest. 48 : 745 - 757 (1969)

* Schindler C.,A.Zermatten,J.P.Felber.
Inhibition by somatostatin of Duodenal Insulin Releasing Activity (DIRA) stimulated by glucose administration.
V Inter. Cong. Endocr. Hambourg 1976.

II PUBLICATIONS SUR LE DIRA.

Felber J.P.,A.Zermatten,J.Dick.
Modulation by food of hormonal system regulating rat pancreatic secretion.
The Lancet II : 185 - 188 (1974).

Felber J.P.,J.Dick.
L'axe entéro - pancréatique.
Médecine et hygiène 1132 : 1 - 4 (1975).

Felber J.P.,A.Zermatten,J.Dick,S.Levine.
Modulation par la nourriture,d'un système hormonal spécifique de la muqueuse duodénale,réglant la sécrétion des fonctions endocrine et exocrine du pancréas.
Schw.Med.Wschr. 105 : 338 - 340 (1975).

Felber J.P.,A.Zermatten.W.Heptner.
Stimulation of insulinogenic duodenal factor(s) by glibenclamide in rats.
Diabetes suppl. 24 : 84 (1975).

Heptner W.,H.M.Kellner,I.Hilwig,A.Zermatten,J.P.Felber.
Untersuchungen über die Beteiligung gastrointestinaler Mediatoren an der antidiabetischen Wirkung von HB 419.
IV Intern.Donau Symp.über Diab.Mel. 30 (1975).

Heptner W.,H.M.Kellner,I.Hilwig,O.Christ,A.Zermatten, J.P.Felber.
Studies on the participation of duodenal insulin releasing activity in the B-cytotropic action of glibenclamide.
Diabetologia 11 : 112 (1975).

Heptner W.,A.Zermatten,H.M.Kellner,O.Christ,J.P.Felber.
Extrapancreatic and pancreatic actions of glibenclamide.
En preparation (1976)

Zermatten A.,J.P.Felber.
Study on the regulation of an hormonal factor from the duodenal mucosa on the release of insulin by the pancreas of normal rats.
Acta Endocr. suppl. 177 : 328 (1973)

Zermatten A.,J.P.Felber.
Regulation d'un facteur B-cytotrope dans la muqueuse duodénale du rat.
Experientia 29 : 749 (1973).

Zermatten A.,J.P.Felber.
Sensitivity to glucose of an intestinal factor stimulating insulin release.
Horm.Metab.Res. 6 : 272 - 274 (1974).

Zermatten A.,J.P.Felber.
Stimulation or inhibition of insulin release by duodenal mucosa extracts removed after carbohydrates, amino acids or fat intake.
Acta Endocr.suppl. 199 : 111 (1975).

Zermatten A.,W.Heptner,B.Delaloye,C.Geser,E.Figueroa, R.Séchaud,J.P.Felber.
Increase of insulin releasing activity from duodenal mucosa after administration of glibenclamide to rat and man.
Diabetologia,abstract 11 : 299 (1975).

Zermatten A.,W.Heptner,J.P.Felber.
Beteiligung von " Duodenal Insulin - Releasing Activity " (DIRA) an der Insulinotropen Wirkung von Nahrungsbestandteillen und glibenclamide in Ratten und Menschen.
IV Intern Donau Symp. über Diab.Mell. 80 .(1975)

Zermatten A.,W.Heptner,B.Delaloye,R.Séchaud,J.P.Felber.
Increase after oral glibenclamide of duodenal insulin releasing activity (DIRA) in man.
En préparation (1976).